

Untersuchungen zu den Unterschieden der Hämoxxygenase-Isoenzyme und deren Zusammenhang mit der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Monika Linnenbaum

aus Gräfelfing

| | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 1.Referent: | Professor Dr. Sönke Behrends |
| 2.Referent: | Professor Dr. Ingo Rustenbeck |
| eingereicht am: | 04.11.2013 |
| mündliche Prüfung (Disputation) am: | 14.02.2014 |

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

M. Linnenbaum, M. Busker, J.R. Kraehling, and S. Behrends (2012) Heme Oxygenase Isoforms Differ in Their Subcellular Trafficking during Hypoxia and Are Differentially Modulated by Cytochrome P450 Reductase. PLoS ONE 7(4): e35483. doi:10.1371/journal.pone.0035483

Tagungsbeiträge

S. Behrends, M. Busker, J.R. Kraehling, **M. Linnenbaum**. 2012. Cytochrome P450 reductase promotes oligomerization and prevents hypoxia induced nuclear translocation of heme oxygenase-1. 7th *International Congress on Heme Oxygenases and Related Enzymes*, 2012. Edinburgh, United Kingdom.

M. Linnenbaum, M. Busker, N. Haase, T. Haase, J.R. Kraehling, S. Oberle, and S. Behrends. 2010. Nuclear translocation of heme oxygenase under cellular stress conditions is isoform specific. *Jahrestagung der DPhG 2010*, Braunschweig.

M. Seeanner, J.R. Kraehling, M. Busker, and S. Behrends. 2010. Distinct NADPH-cytochrome P450 reductase dependence of heme oxygenase-1 and heme oxygenase-2. *World Pharma 2010, 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology*, Copenhagen, Denmark.

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 9 |
| 1.1 | Die Hämoxygenasen | 10 |
| 1.1.1 | Das Häm und seine Abbauprodukte | 14 |
| 1.1.1.1 | Das Häm | 14 |
| 1.1.1.2 | Das Eisen | 14 |
| 1.1.1.3 | Kohlenstoffmonoxid..... | 15 |
| 1.1.1.4 | Biliverdin und Bilirubin | 16 |
| 1.1.2 | Die NADPH-abhängige Cytochrom-P450-Oxidoreduktase..... | 17 |
| 1.1.3 | Die Biliverdinreduktase | 17 |
| 1.2 | Der NO/cGMP-Signalweg..... | 18 |
| 1.2.1 | Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase | 20 |
| 1.2.1.1 | Endogene Aktivatoren der NOsGC | 21 |
| 1.2.1.2 | Modulatoren der NOsGC | 22 |
| 1.2.2 | Das cGMP-Effektorsystem..... | 25 |
| 2 | Problemstellung und Zielsetzung | 26 |
| 3 | Material und Methoden | 27 |
| 3.1 | Material..... | 27 |
| 3.1.1 | Chemikalien und Reagenzien | 27 |
| 3.1.2 | Reagenziensysteme..... | 29 |
| 3.1.3 | Lösungen, Puffer und Medien | 30 |
| 3.1.4 | Stammlösungen | 31 |
| 3.1.5 | Gele..... | 32 |
| 3.1.6 | Vektoren | 32 |
| 3.1.7 | Primer und Oligonukleotide | 32 |
| 3.1.8 | Enzyme | 34 |
| 3.1.9 | Zelllinien..... | 34 |
| 3.1.9.1 | Prokaryotische Zellen | 34 |
| 3.1.9.2 | Eukaryotische Zellen | 34 |
| 3.1.10 | Antikörper..... | 34 |
| 3.1.11 | Geräte und Hilfsmittel | 35 |
| 3.2 | Molekularbiologische Methoden | 39 |
| 3.2.1 | Klonierung zur Herstellung neuer DNA-Konstrukte..... | 39 |
| 3.2.1.1 | Klonierung der HOs und der hBVR | 40 |
| 3.2.1.2 | <i>Strep-tag</i> [®] II-Klonierung an die HO-1-Konstrukte | 40 |
| 3.2.1.3 | <i>Strep-tag</i> [®] II-Klonierung an die HO-2-Konstrukte | 41 |
| 3.2.1.4 | Fluoreszenzprotein-Klonierung an die HO-1-Konstrukte | 41 |
| 3.2.1.5 | Fluoreszenzprotein-Klonierung an die HO-2-Konstrukte | 42 |
| 3.2.1.6 | Fluoreszenzprotein-Klonierung an die CPR..... | 42 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2.1.7 | Fluoreszenzprotein-Klonierung an die hBVR | 43 |
| 3.2.1.8 | Klonierungen der NOsGC-Untereinheiten | 43 |
| 3.2.2 | Mutagenese von Plasmid-DNA | 43 |
| 3.2.2.1 | Herstellung einer inaktiven HO-1 Mutante..... | 44 |
| 3.2.2.2 | Herstellung einer inaktiven HO-2 Mutante..... | 44 |
| 3.2.2.3 | Herstellung einer carboxy-terminal verkürzten HO-1 Mutante..... | 44 |
| 3.2.2.4 | Herstellung einer carboxy-terminal verkürzten HO-2 Mutante..... | 44 |
| 3.2.2.5 | Mutation der CPF-Motive der HO-2..... | 44 |
| 3.2.2.6 | Mutation des CPF-Motivs der α_1 -Untereinheit der NOsGC | 45 |
| 3.2.3 | Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Top10 Zellen..... | 45 |
| 3.2.4 | Transformation und Transposition von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen | 45 |
| 3.2.5 | Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> -Zellen | 46 |
| 3.2.6 | Analyse von Plasmid-DNA..... | 47 |
| 3.2.7 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 47 |
| 3.3 | Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur | 48 |
| 3.3.1 | Rekombinante Proteinexpression durch Baculoviren | 48 |
| 3.3.1.1 | Kultivierung von Sf9-Zellen | 49 |
| 3.3.1.2 | Transfektion und Amplifikation zur Baculoviren-Produktion..... | 50 |
| 3.3.1.3 | Bestimmung des Baculovirustiters | 50 |
| 3.3.1.4 | Infektion von Sf9-Zellen zur Proteinexpression | 51 |
| 3.3.1.5 | Proteingewinnung aus infizierten Sf9-Zellen | 52 |
| 3.3.2 | Rekombinante Proteinexpression durch HEK293-Zellen..... | 52 |
| 3.3.2.1 | Kultivierung von HEK293-Zellen | 52 |
| 3.3.2.2 | Transfektion von HEK293-Zellen zur Proteinexpression..... | 53 |
| 3.3.3 | Bestimmung des Proteingehaltes | 53 |
| 3.3.4 | Proteinanreinigung mit Hilfe eines <i>Strep-tags</i> [®] II | 54 |
| 3.3.4.1 | Anreinigung der HOs | 55 |
| 3.3.4.2 | Anreinigung der NOsGC | 55 |
| 3.3.5 | Gelfiltrationschromatografie | 56 |
| 3.3.6 | Enzymaktivitätsbestimmungen | 57 |
| 3.3.6.1 | Bestimmung der Hämoxygenase-Aktivität..... | 57 |
| 3.3.6.2 | Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität..... | 58 |
| 3.3.7 | Proteinnachweis | 60 |
| 3.3.7.1 | SDS-PAGE | 60 |
| 3.3.7.2 | Western-Blot und Immundetektion..... | 60 |
| 3.3.7.3 | Ponceau S Färbung | 61 |
| 3.3.7.4 | Coomassie-Gelfärbung | 61 |
| 3.3.8 | Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie | 61 |
| 3.3.8.1 | Fluoreszierende Proteine | 62 |
| 3.3.9 | Translokationsversuche der Hämoxygenase | 62 |
| 3.3.10 | Bestimmung der FRET-Effizienzen..... | 63 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.3.10.1 | FRET Messungen am Spektrofluorimeter | 65 |
| 3.3.10.2 | Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer | 66 |
| 3.3.11 | Zytotoxizitätstest | 67 |
| 3.3.12 | Bestimmung des Redoxstatus | 68 |
| 3.3.13 | Statistische Auswertung | 68 |
| 4 | Ergebnisse..... | 69 |
| 4.1 | Die HO..... | 69 |
| 4.1.1 | Untersuchungen der CPR-Abhängigkeit | 69 |
| 4.1.1.1 | Enzymaktivität in Cytosol und Homogenisat..... | 69 |
| 4.1.1.2 | Enzymaktivität nach der Anreinigung | 71 |
| 4.1.1.3 | CPR-Konzentrationsabhängigkeit von angereinigter HO | 71 |
| 4.1.2 | Koexpression von HO und CPR..... | 72 |
| 4.1.2.1 | SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse der Anreinigungen | 73 |
| 4.1.2.2 | Enzymaktivität der HO-CPR-Koinfektionen | 75 |
| 4.1.2.3 | Einfluss von CPR auf die HO-Oligomerisierung | 76 |
| 4.1.2.4 | FLIM-Untersuchungen zur HO-Oligomerisierung..... | 78 |
| 4.1.2.5 | Untersuchung der HO-CPR-Interaktion durch FRET-Messung | 79 |
| 4.1.2.6 | Untersuchung der HO-CPR-Interaktion durch FLIM | 81 |
| 4.1.3 | Translokationsversuche unter Hypoxie | 83 |
| 4.1.3.1 | Einzeltransfektion..... | 83 |
| 4.1.3.2 | Koexpression mit der CPR | 85 |
| 4.1.3.3 | Koexpression mit der hBVR | 86 |
| 4.1.3.4 | Zytotoxizitätsversuche nach Hypoxie-Inkubation..... | 87 |
| 4.2 | Das CPF-Motiv | 88 |
| 4.2.1 | Untersuchungen des CPF-Motivs der HO-2..... | 88 |
| 4.2.1.1 | HO-Enzymaktivitätsbestimmung der CPF-Mutante | 89 |
| 4.2.1.2 | Translokationsversuch durch Hämin | 89 |
| 4.2.1.3 | Zytotoxizitätsversuche nach Hämin-Inkubation..... | 91 |
| 4.2.2 | Untersuchungen des CPF Motivs der NOsGC-Untereinheit..... | 91 |
| 4.2.2.1 | Hämin-Abhängigkeit im Vergleich zur CPF-Mutante | 92 |
| 4.2.2.2 | Bestimmung des Redox-Potenzials | 94 |
| 4.3 | Die NOsGC und die HO | 95 |
| 4.3.1 | Untersuchungen der NOsGC-HO-Koexpression..... | 95 |
| 4.3.1.1 | HO-Enzymaktivitätsbestimmung der inaktiven Mutanten..... | 95 |
| 4.3.1.2 | Enzymaktivitätsuntersuchungen der NOsGC-HO-Koexpression | 96 |
| 4.3.1.3 | Expressionsuntersuchung der NOsGC-HO-Koexpression..... | 98 |
| 5 | Diskussion..... | 100 |
| 5.1 | Die HO..... | 100 |
| 5.2 | Das CPF-Motiv | 105 |
| 5.3 | Die NOsGC und die HO | 109 |

| | | |
|----------|------------------------------------|------------|
| 6 | Zusammenfassung..... | 112 |
| | Literaturverzeichnis..... | 113 |
| | Abbildungsverzeichnis | 137 |
| | Abkürzungsverzeichnis..... | 138 |

1 Einleitung

Herz-Kreislaufkrankungen waren laut Statistischem Bundesamt im Jahr 2011 die häufigste Todesursache in Deutschland. Chronisch ischämische Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz machten zusammen 19,7 % der Todesfälle aus (Statistisches Bundesamt). Die Krankheitskosten für diese Krankheitsklasse nahmen den Spitzenplatz in Deutschland im Jahr 2008 ein (Statistisches Bundesamt). Die häufigste Ursache der Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist die Atherosklerose, welche durch Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Rauchen und Adipositas begünstigt wird. Diese Risikofaktoren stehen alle im Zusammenhang mit oxidativem Stress. Dieser ist definiert als ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Substanzen im Körper, mit dem Gewicht auf Seite der Prooxidantien, was potentiell Schäden verursacht (Sies, 1985, Sies, 1991). Zu den prooxidativen Substanzen zählen reaktive Sauerstoff-(und Nitrogen-)Spezies (RO(N)S). Dazu gehören freie Radikale wie das Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale (OH^{\cdot}), Stickstoffmonoxid (NO), Nitroxylradikale und Peroxynitrit. Freie Radikale besitzen positive Wirkungen, wie z.B. bei der Bekämpfung von Mikroorganismen durch die Beteiligung an der unspezifischen zellulären Immunabwehr, gelten aber in größeren Mengen als schädlich. Sie sind in der Lage Zellstrukturen, Proteine und das Erbgut zu verändern. Die Lipidperoxidation ist beteiligt an der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen. RONS werden weiterhin diskutiert als Verursacher von Tumor-, rheumatischen- und neurodegenerativen Erkrankungen. Zur Bekämpfung der RONS stehen dem Körper verschiedene endogene nicht-enzymatische und enzymatische Mechanismen zur Verfügung. Zu den antioxidativ wirkenden körpereigenen Stoffen gehören Biliverdin und Bilirubin. Die wichtigsten enzymatischen Vertreter sind die Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidasen und die Katalase. Mit der Nahrung können ebenfalls antioxidativ wirkende Substanzen wie die Vitamine E und C zugeführt werden (Burton et al., 1983, Sahnoun et al., 1997, Padayatty et al., 2003). In einer neuen Definition von oxidativem Stress wird dessen Entstehung auf die Störung von Redoxsignalwegen und deren Kontrolle zurückgeführt, da oxidativer Stress auch auftreten kann, wenn das Gleichgewicht zwischen Pro- und Antioxidantien nicht gestört ist (Jones, 2006).

Zellen können sich vor verschiedenen Arten von Stress wie Hyperthermie, oxidativem Stress, Schwermetallen oder anderen Toxinen schützen durch die Bildung von Hitze-Schock-Proteinen (HSP). Das HSP32 ist ein 32 kDa großes Protein und wurde später in der Ratte als Hämoxxygenase-1 (HO-1) identifiziert (Shibahara et al., 1987). Die physiologischen Wirkungen des HO-Systems, der beiden HO-Isoenzyme, des Substrates Häm und der Abbauprodukte, haben eine große Bedeutung als Auslöser, aber vor allem bei der Bekämpfung von oxidativem Stress bekommen. Untersuchungen zeigen vielfältige Interaktionen der HO-Formen mit dem NO/cGMP-Signalweg, insbesondere der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NOsGC), einem Hauptakteur im

Die physiologische Hauptfunktion der beiden Enzyme ist der Abbau von freiem Häm im Körper durch Spaltung der α -Mesocarbonbrücke unter der Freisetzung von Eisen, Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin (Tenhunen et al., 1968, Tenhunen et al., 1969). Dieses wird umgehend durch die Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin reduziert. Für den Hämabbau werden 3 Moleküle Sauerstoff und sieben Elektronen benötigt. Letztere werden durch NADPH bereitgestellt (Schacter et al., 1972). Die Übertragung erfolgt durch die NADPH-abhängige Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (CPR) (s. Abbildung 1.2). Die CPR ist wie die beiden HO-Formen im ER verankert (Yoshida and Sato, 1989, Wang et al., 1997a).

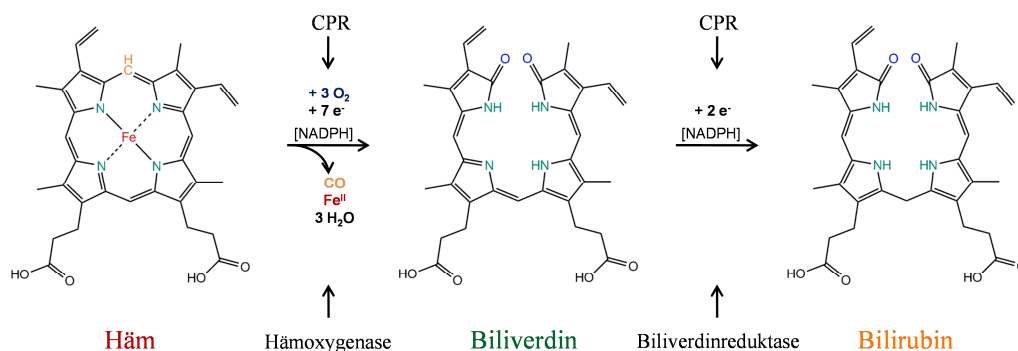


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht des Hämabbaus. Häm wird durch die HO zu Biliverdin abgebaut, welches durch die BVR weiter zu Bilirubin reduziert wird. Die Reaktionsschritte sind abhängig von NADPH, Sauerstoff und der CPR.

Die HO-1 ist ein relativ instabiles Enzym. Milde Trypsinisierung führt bei in *E.coli* exprimierter HO-1 zu einer 28 kDa großen Form durch Verlust des carboxy-terminalen Membranankers. Diese Form ist nicht mehr in der Lage das zweite Elektron, nötig für die Hämdegradation, zu empfangen (Yoshida et al., 1991). Die Expression einer vollständigen HO-1 führt in den Membranen zu einem 32 kDa großen Protein, während in der löslichen Fraktion eine 30 kDa große Form detektiert werden konnte (Ishikawa et al., 1991). Diese Formen sind beide katalytisch aktiv. Ein intakter carboxy-terminaler Bereich führt allerdings zu einer erhöhten Bindungsaffinität mit der CPR (Huber and Backes, 2007, Huber et al., 2009). Hypoxie oder Hämin können zu einem Abbrechen des carboxy-terminalen Membranankers führen. Diese verkürzte Form liegt cytosolisch in der Zelle vor. Sie besitzt die Fähigkeit in den Zellkern zu translozieren, wo sie vermutlich Gene von Transkriptionsfaktoren hochreguliert, die an der oxidativen Stress-Antwort beteiligt sind (Lin et al., 2007). Die Regulation der HO-1 kann durch verschiedene Polymorphismen im HMOX-1-(HO-1 Gen-) Promotor beeinflusst werden: $(\text{GT})_n$ -Längen- und Single-Nukleotid-Polymorphismen (T(-413)A und G(-1135)A) (Kimpara et al., 1997, Ono et al., 2003). Die Länge der $(\text{GT})_n$ -Wiederholungen variiert zwischen 12 und 40. Niedrige $(\text{GT})_n$ -Wiederholungszahlen erhöhen die Transkriptionsrate von HO-1 (Hirai et al., 2003, Chen et al., 2002a). Beide Polymorphismen stehen im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen, z.B. Herz-Kreislauf- oder pulmonalen Erkrankungen (zur Übersicht s. Exner et al., 2005).

Eine weitere Regulation der HO-1-Expression erfolgt über NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) und BACH1 (*BTB and CNC homolog-1*). NRF2 bildet Heterodimere mit kleinen Maf Proteinen. Als Transkriptionsfaktoren binden diese am Promotor an eine spezifische Sequenz, die als *Maf recognition elements* bezeichnet wird. Dadurch wird die HO-1-Expression aktiviert. Die Bindung von BACH1 an *Maf recognition elements* führt zu einer Repression der HO-1-Expression. Durch Bindung von Häm an BACH1 kann diese aufgehoben werden (Ogawa et al., 2001, Sun et al., 2002). Hypoxie führt in humanen Zellen zu einer Induktion von BACH1 und damit zu einer verminderten HO-1-Expression (Kitamuro et al., 2003). Die HO-1 spielt eine Rolle bei verschiedenen Krankheiten, deren Pathogenese meist mit oxidativen Stress und inflammatorischen Prozessen in Zusammenhang stehen. Bei Diabetes mellitus konnte sowohl eine erhöhte als auch eine verminderte HO-1-Expression in Abhängigkeit der Zellen festgestellt werden (Avogaro et al., 2003, da Silva et al., 1997). Eine HO-1-Überexpression könnte vor neurologischen Schäden durch die Beeinflussung von Tau- und β -Amyloid-Proteinen bei Alzheimer schützen (Takeda et al., 2000, Le et al., 1999). Die Rolle von HO-1 bei der Entstehung der schweren zerebralen Malaria ist kontrovers, sowohl eine Induktion als auch eine Repression werden als positiv beschrieben (Takeda et al., 2005, Pamplona et al., 2007, Walther et al., 2012). Veränderte HO-1-Expressionen konnten u. a. auch bei Asthma, Präeklampsie oder bei Hirn- und Urogenital-Tumoren identifiziert werden (zur Übersicht s. Yamaya and Shibahara, 2005). Bisher ist ein Fall von HO-1-Defizienz beim Menschen beschrieben worden. Der Junge litt unter starker Wachstumsretardierung und Entwicklungsverzögerungen. Er zeigte verminderte Bilirubinwerte trotz intravaskulärer Hämolyse und Abnormalitäten im Koagulations-/Fibrinolysesystem (Yachie et al., 1999). Er entwickelte renale Tubuli- und vaskuläre Endothelschäden. Im Alter von sechs Jahren verstarb er an intrakranieller Hämorrhagie (Ohta et al., 2000). HO-1-defiziente Mäuse sind stark reduziert in ihrer Überlebensfähigkeit, zeigen eine Anämie und eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Stress (Poss and Tonegawa, 1997a, Poss and Tonegawa, 1997b). HO-2-defiziente Mäuse hingegen sind fertil und haben eine Lebenserwartung von einem Jahr (Poss et al., 1995). Allerdings konnten auch Abnormalitäten bei der Ejakulation gezeigt werden (Burnett et al., 1998). Die Lungen HO-2-defizienter Mäuse zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Schäden, verursacht durch Hyperoxie, trotz zweifach erhöhter HO-1 Expression (Dennery et al., 1998). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine HO-2-Defizienz durch eine erhöhte HO-1-Expression ausgeglichen werden kann (Ding et al., 2006). Dies scheint *in vivo* aber stark abhängig von der Lokalisation zu sein.

Wie bei der HO-1 konnten auch bei der HO-2 Polymorphismen identifiziert werden. Für ein SNP konnte ein Zusammenhang mit Parkinson gezeigt werden (Ayuso et al., 2011). Die HO-2 ist im Gegensatz zur HO-1 nicht induzierbar, allerdings konnten Modulationen der Enzymaktivität festgestellt werden. Eine Abschwächung der zytoprotektiven Wirkung der HO-2 und der HO-1 konnte bei Alzheimer festgestellt

werden durch die Bindung des Amyloid-Precursor Proteins an die HO. Dies führte zu einer reduzierten Enzymaktivität und dadurch zu einer Verminderung des antioxidativen Bilirubins (Takahashi et al., 2000). Die Interaktion von HO-1 und HO-2 führt ebenfalls zu einer Reduzierung der Aktivität. Dies könnte allerdings einen positiven Regulationsmechanismus darstellen, da durch starke Induktion der HO-1 die Gefahr von zu hohen, schädlichen Eisenkonzentrationen im Hirn droht (Weng et al., 2003). Die Bindung von Calmodulin an die HO-2 ist Calcium-abhängig und führt zu einer Aktivitätssteigerung (Boehning et al., 2004). Eine Aktivitätssteigerung resultiert auch aus einer Phosphorylierung der HO-2 durch die Proteinkinase C und die Casein-Kinase-2 (Dore et al., 1999, Boehning et al., 2003). Die Aktivitätssteigerungen potenzieren die neuroprotektive Wirkung der HO-2, die über Bilirubin und CO vermittelt werden (Dore et al., 1999, Zakhary et al., 1997).

Die Struktur der HO-2 weist im Gegensatz zur HO-1 drei hämregulierende Motive (HRM) auf, welche aus der Aminosäurenabfolge Cystein und Prolin bestehen. Ein Motiv (HRM3) ist an der Cysteinposition 127 lokalisiert, die beiden anderen Motive im carboxy-terminalen Bereich an den Cysteinpositionen 265 (HRM1) und 282 (HRM2) (Zhang and Guarente, 1995). Den Letztgenannten folgt neben dem Prolin auch ein Phenylalanin, weshalb sie in dieser Arbeit als CPF-Motive bezeichnet werden. Diese beiden Motive können Häm binden, sind aber nicht am Hämabbau beteiligt (McCoubrey et al., 1997a). Eine Bindung von NO an die HO-2 führt zu einer Abschwächung der Enzymaktivität, die durch Mutation von HRM1 und 2 wieder aufgehoben werden kann (Ding et al., 1999). Es wird vermutet, dass die Hämbindung über die HRMs ein Reservoir gasförmiger Signalmoleküle darstellt (Huang et al., 2001). HRM1 und HRM2 können miteinander Disulfidbrücken ausbilden, was als Redox-Regulator fungiert. Die Disulfidbildung beeinflusst die Hämbindung an die HO-2. Liegen die freien Dithiole vor, beträgt der K_d von HO-2 für Häm $0,35 \mu\text{M}$, während im Disulfidstatus der K_d auf $0,03 \mu\text{M}$ absinkt (Yi and Ragsdale, 2007). Die HRMs zeigen ein Redox-Potential von -200 mV , was dem der umgebenden Zelle entspricht (-170 bis -250 mV). Unter reduzierten Bedingungen, z.B. bei Hypoxie, liegen die Cysteine überwiegend in der Dithiolform vor, während unter oxidativen Bedingungen, z.B. bei oxidativen Stress, die Disulfidform vorherrschend ist. Der Redoxwechsel der HRMs beeinflusst damit über die Affinität der Hämbindung die Aktivität der HO-2 (Yi et al., 2009). HO-2, Häm und CO können mit dem Calcium-abhängigen Kalium-Kanal (BK_{CA} -Kanal) in den Glomus-Zellen im Karotis-Körper interagieren. Dieser wird unter hypoxischen Bedingungen inhibiert, wodurch die Ventilation steigt (Lopez-Barneo et al., 1988, Peers, 1990). Der BK_{CA} -Kanal unterliegt einer Redox-Regulation bei der Bindung von Häm. Diese ist allerdings gegensätzlich zur HO-2. Freie Thiole im reduzierten Zustand erhöhen, im Vergleich zur Disulfidform, die Hämbindung, wodurch der BK_{CA} -Kanal inhibiert wird. CO wiederum kann unter normoxischen Bedingungen den Kanal aktivieren (Yi et al., 2010). Dies bestätigt die Vermutung, dass die HO-2 durch das freigesetzte CO einen Sauerstoffsensor darstellen könnte (Williams et al.,

2004). Ergebnisse in HO-2-defizienten Mäusen erbrachten hierüber allerdings widersprüchliche Erkenntnisse (Adachi et al., 2004b, Ortega-Saenz et al., 2006).

1.1.1 Das Häm und seine Abbauprodukte

1.1.1.1 Das Häm

Häm besteht aus einem Porphyrin-Gerüst und einem zentralen Eisenatom. Die Hämformen unterscheiden sich in den Substituenten des Porphyrin-Gerüsts. Der bekannteste und wichtigste Vertreter, der oft auch einfach als Häm bezeichnet wird, ist das Häm *b*. Dieses besteht aus Protoporphyrin IX (PPIX) und als zentralem Atom einem zweiwertigen Eisenatom. Hämin ist ein Häm *b*-Derivat, bei dem das Eisen in dreiwertiger Form vorliegt und das ein Chlorid-Ion als Liganden besitzt. Durch die erhöhte Stabilität wird es gerne zu experimentellen Zwecken herangezogen. Gebildet wird Häm durch die δ -Aminolävulinsäure-Synthase (ALAS), welche Succinyl-Co A und die Aminosäure Glycin zu δ -Aminolävulinsäure (ALA) synthetisiert. Über verschiedene Zwischenschritte, bei denen u. a. die ALA-Dehydrogenase und die Porphobilinogen-Deaminase beteiligt sind, entsteht Protoporphyrin IX (PPIX). Durch die Ferrochelatase erfolgt der Einbau des Eisens. Häm liegt im Körper zum größten Anteil an Globine gebunden vor (Hämoglobin und Myoglobin) und übernimmt dort den Sauerstofftransport. Häm ist außerdem Bestandteil weiterer Hämoproteine, die unterschiedliche physiologische Aufgaben erfüllen. Hämoproteine können als Katalasen (Cytochrom C Oxidase und Peroxidasen) oder als Signaltransduktoren wie bei der NOsGC (s. Kapitel 1.2.1) oder den NO-Synthasen fungieren. Hämoglobin ist im Körper Bestandteil von Erythrozyten. Nach 120 Tagen Lebensdauer werden die Erythrozyten in der Milz abgebaut, wodurch Häm freigesetzt wird. In nicht-gebundener Form (freies Häm) hat es regulatorische Aufgaben wie z.B. die Repression von ALAS, die Induktion von HO-1 oder die Derepression von BACH1. Übersteigen die Spiegel von freiem Häm die Konzentration von 1 μM , so überwiegen die toxischen Eigenschaften des Häms. Häm kann prooxidativ wirken, indem es die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Fenton-Reaktion katalysiert. Freies Häm kann durch Hämopexin abgefangen werden und zur Leber transportiert werden. Sobald die Plasmaspiegel von Hämopexin überschritten werden, würden Zellschäden durch Häm entstehen. Aus diesem Grund erfolgt eine weitere, wichtige Regulierung freier Hämspiegel durch die HOs, welche Häm bei einer Konzentration von 0,4 - 1 μM abbauen (Sassa, 2004).

1.1.1.2 Das Eisen

Der menschliche Körper besitzt 3,7 g Eisen, welches komplett durch die Nahrung zugeführt wird. Die Freisetzung von Eisen durch die HO-1 stellt ein wichtiger Regulator des Eisenspiegels dar. HO-1-defiziente Mäuse zeigen eine Hypoferriämie (Poss and Tonegawa, 1997a). Eisen ist physiologisch wichtig als Bestandteil von Hämoproteinen

und von Proteinen, die an der Elektronen-Transport-Kette beteiligt sind, z.B. bei der Bildung von ATP. Ein Eisenmangel äußert sich durch eine mikrozytäre, hypochrome Anämie. Zu den Symptomen gehören blasse Haut, Müdigkeit, erhöhte Infektanfälligkeit, Mundwinkelrhagaden, brüchige Nägel und Haarausfall. Ein Überschuss an Eisen liegt in der Zelle gebunden an Ferritin vor. Sobald es in die Ferritinhülle aufgenommen wurde, liegt es in dreiwertiger Form vor. Transferrin dient als Eisentransportform. Es bindet Eisen und transportiert es zu Zellen, die Eisen benötigen, z.B. zum Knochenmark, wo es für die Neusynthese von Erythrozyten herangezogen werden kann (Ponka et al., 1998). Zu hohe Eisenkonzentrationen fördern über die Fenton-Reaktion die Bildung von Sauerstoffradikalen, woraus Gewebeschäden resultieren können.

1.1.1.3 Kohlenstoffmonoxid

CO ist ein farb- und geruchloses Gas. Sein Gehalt in der Atemluft beträgt 0,1 %. Erhöhte Konzentrationen können durch unvollständige Verbrennung kohlenstoffhaltiger Verbindungen entstehen, z.B. bei Rauch und Abgasen. CO ist vor allem für seine toxischen Eigenschaften bekannt. Im Körper kann es an Stelle von Sauerstoff an Häm binden, da es eine mehr als 200-fach höhere Affinität besitzt (Rodkey et al., 1974). Im Gewebe führt dies zu einer Hypoxie. Zusätzlich kann das CO an Hämoproteine wie Myoglobin oder die Cytochrom C-Oxidase binden, was zu einem Funktionsverlust führt. Besonders sauerstoffabhängige Organe wie Gehirn und Herz sind betroffen. Ein CO-Hämoglobin (CO-Hb)-Gehalt von 1-3 % ist physiologisch durch die endogene Produktion von CO. Ab einem Wert von 5 % können bereits Beschwerden in Form von Müdigkeit, Kopfschmerzen und kognitiven Veränderungen auftreten. Erhöht sich der CO-Hb-Gehalt schlagartig auf Werte größer 25 %, kann dies zum Erstickungstod führen. Die Therapie einer CO-Intoxikation erfolgt durch Gabe erhöhter Mengen an (hyperbarem) Sauerstoff (Piantadosi, 2002). Bereits 1991, kurz nach Entdeckung der physiologischen Bedeutung von NO, wurde auch über eine physiologische Bedeutung von CO spekuliert (Marks et al., 1991). CO wirkt vasorelaxierend über die Erhöhung von cGMP durch die Aktivierung der NOsGC und cGMP-unabhängig über die Aktivierung BK_{Ca}-Kanäle in Muskelzellen der Gefäße (Wang et al., 1997b). CO bindet dabei an Häm und hebt dadurch den inhibitorischen Effekt von Häm auf den BK_{Ca}-Kanals auf (Jaggar et al., 2005). Durch HO-2-*knock-out*-Versuche konnte eine Rolle von CO bei der neuronalen intestinalen Relaxation identifiziert werden (Zakhary et al., 1997). CO kann weiterhin die Bildung von NO, durch die Aktivierung der NOS erhöhen. NO wiederum kann die HO-1 induzieren, was zu einer Erhöhung des CO-Gehaltes führt (Zuckerbraun et al., 2003). Über die NO-CO-Interaktion und die Aktivierung der NOS durch CO existieren allerdings widersprüchliche Veröffentlichungen. Thorup et al. zeigten eine Suppression der NOS durch CO und eine NO-Freisetzung aus einem intrazellulären Vorrat (Thorup et al., 1999). CO kann über eine ROS-induzierte Akt-Phosphorylierung NFκB aktivieren und dadurch leberprotektiv

wirken (Zuckerbraun et al., 2003, Kim et al., 2008). Antiinflammatorische Effekte resultieren u. a. aus der Aktivierung von p38 mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) durch CO (Otterbein et al., 2000). Dadurch kommt es nachfolgend zu einer Beeinflussung von HSP 70 und Calveolin-1, woraus cytoprotektive und antiproliferative Effekte resultieren (Kim et al., 2005b, Kim et al., 2005a). Otterbein und Kollegen waren auch die ersten, die in Studien *in vivo* einen positiven Effekt von niedrig dosiertem CO auf, durch Hyperoxie hervorgerufene, Lungenschädigungen zeigen konnten (Otterbein et al., 1999). Mittlerweile gibt es viele Studien über protektive Wirkungen an fast allen lebenswichtigen Organen (z. Übersicht s. Bauer and Pannen, 2009). CO hat weiterhin antibakterielle Wirkungen (Desmard et al., 2009), welche auch zu einer reduzierten Letalität nach einer Sepsis führen können (gezeigt in Mäusen durch Chung et al., 2008).

1.1.1.4 Biliverdin und Bilirubin

Durch die rasche Umwandlung von Biliverdin (IX α) zu Bilirubin (IX α), durch die BVR, sind im Menschen kaum messbare Konzentrationen von Biliverdin vorhanden. Bilirubin liegt zum größten Teil gebunden an Serumalbumin vor, da es nicht wasserlöslich ist. In den Hepatozyten der Leber findet eine Konjugation der Propionyl-Seitenketten v.a. mit Glucuronsäure statt, bevor es in die Galle transportiert wird. Dort wird es umgewandelt zu Urobilinogen und Urobilin, welche über den Stuhl ausgeschieden werden. Stocker et al. waren die ersten, die einen physiologischen, antioxidativen Effekt von Bilirubin vermuteten. In Studien *in vitro* konnte gezeigt werden, dass an Albumin gebundenes Bilirubin abhängig von dem Sauerstoffgehalt (max. 2 %) höhere antioxidative Eigenschaften besitzt als α -Tocopherol (Stocker et al., 1987b, Stocker et al., 1987a). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass Bilirubin oxidativen Schaden an Serumproteinen und Lipiden, welcher durch Hyperoxie verursacht wurde, verhindern kann (Dennery et al., 1995). Einen weiteren antioxidativen Effekt besitzt Bilirubin durch die Fähigkeit NO zu binden, welches im Überschuss nitrosativen Stress ausüben kann (Mancuso et al., 2003, Barone et al., 2009). Bilirubin kann das Risiko für Krankheiten des Koronarsystems senken. Dabei entsprechen die positiven Wirkungen denen von HDL-Cholesterin (Hopkins et al., 1996). Eine vergleichbare Korrelation gibt es auch zwischen Bilirubin und dem Atheroskleroserisiko, da Bilirubin durch die Inhibition von p38 MAPK antiproliferativ auf Zellen der glatten Gefäßmuskulatur wirkt (Ollinger et al., 2007). Auch Endothelzellen können durch Bilirubin vor oxidativem Stress geschützt werden (Oberle et al., 2003). Weiterhin wird Bilirubin in nanomolarer Konzentrationen eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen (Dore et al., 1999). Die Effektivität von Bilirubin resultiert u. a. daraus, dass es durch ROS zu Biliverdin oxidiert wird, welches anschließend rasch wieder durch die BVR reduziert wird (Baranano et al., 2002). Zu hohe Bilirubinkonzentrationen allerdings können einen Ikterus hervorrufen, welcher sich durch Gelbfärbung der Haut und Schleimhäute äußert. Überwindet Bilirubin die Blut-Hirnschranke, kann ein Kernikterus entstehen. Dieser ist definiert durch eine makroskopische Gelbfärbung von Hirnnuklei in Kombination mit dem Auftreten von

neuronalen Schäden (Ahdab-Barmada and Moossy, 1984). Besonders gefährdet für das Auftreten des Ikterus sind Neugeborene, Lebererkrankte und Menschen mit dem Gilbert-Syndrom, einem Gendefekt, wodurch erhöhte Plasmabilirubinwerte entstehen.

1.1.2 Die NADPH-abhängige Cytochrom-P450-Oxidoreduktase

Die CPR ist Bestandteil des Cytochrom P450-(CYP)-Enzymsystems, zu dem auch die CYP-Enzyme gehören. Die CYP-Enzyme haben gemein, dass sie eine Hämgruppe besitzen und diese im Komplex mit CO im UV-Licht ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweist, woraus auch der Name resultiert (Klingenberg, 1958). Die CPR dient als Elektronenüberträger von NADPH auf die CYP-Monooxygenasen (Lu and Coon, 1968), aber u. a. auch auf die Hämoxygenasen (Schacter et al., 1972), Squalen-Monooxygenase (Ono and Bloch, 1975) und Cytochrom b₅ (Enoch and Strittmatter, 1979). Dadurch ist sie an der Steroidsynthese, am Arzneistoffmetabolismus und am Hämabbau beteiligt. Die CPR gehört zu der Familie der Flavoproteine, ist 77 kDa groß und enthält als Co-Faktoren Flavin-Adenin-dinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) (Iyanagi and Mason, 1973). Diese sind beteiligt bei der Elektronenübertragung im CYP-System, bei dem erst das Elektron von NADPH auf das FAD und anschließend auf das FMN übertragen wird, bevor es an das Hämoprotein abgegeben wird (Iyanagi et al., 1974, Vermilion and Coon, 1978). Die CPR ist mit ihrem hydrophoben N-terminalen Bereich im ER verankert. Der anschließende hydrophile Bereich unterteilt sich in die FMN-Binderegion, die Verknüpfungsregion und die FAD- und NADPH-Binderegion (Wang et al., 1997a, Xia et al., 2011). Neben der Fähigkeit die Aktivität der CYP-Enzyme zu regulieren, kann die CPR auch die Proteinlevel der CYP-Enzyme kontrollieren, wobei auch die HO beteiligt ist (Ding et al., 2001). Mutationen der CPR führen zu einer Reduktion der HO-1-Aktivität (Pandey et al., 2010, Marohnic et al., 2011). Das Antley-Bixler-Syndrom wird auf verschiedene Gendefekte der CPR zurückgeführt. Es ist u. a. gekennzeichnet durch das Auftreten einer Kraniosynostose, Synostosen von Oberarmknochen und Speiche und einer Hypoplasie des Mittelgesichts. Dieses Syndrom kann in Kombination mit genitalen Anomalien und/oder einer gestörten Steroidsynthese einhergehen (Fluck et al., 2004, Adachi et al., 2004a). Eine CPR-Gendefizienz kann weiterhin zu einer kongenitalen adrenalen Hyperplasie führen (Arlt et al., 2004, Fluck et al., 2008).

1.1.3 Die Biliverdinreduktase

Bereits 1936 studierte Lemberg die Reduktion von Biliverdin zu Bilirubin im Gewebe, konnte die Reaktion aber keinem Enzym zuordnen (Lemberg and Wyndham, 1936). Im Jahre 1961 konnte gezeigt werden, dass die BVR die Doppelbindung zwischen dem zweiten und dritten Pyrrolrings des Biliverdins in eine Einfachbindung konvertieren kann (Singleton and Laster, 1965). Tenhunen et al. zeigte eine NADPH-Abhängigkeit der BVR (Tenhunen et al., 1970). Eine genauere Charakterisierung der BVR in Ratten

ergab, dass sie das einzige Enzym ist, das zwei verschiedene Co-Faktoren bei unterschiedlichen pH-Optima verwendet. Im sauren pH-Bereich ist dies NADH und im alkalischen NADPH (Kutty and Maines, 1981). Anschließend konnten vier verschiedene Isoformen der humanen BVR (hBVR), jeweils zwei Biliverdin IX α - (III und IV) und zwei Biliverdin IX β -Reduktasen (I und II) identifiziert werden (Yamaguchi et al., 1994). Die jeweilige cDNAs konnten 1996 durch Komuro kloniert werden (Komuro et al., 1996b, Komuro et al., 1996a). Die Isoformen III und IV haben ein Molekulargewicht von 34 kDa und sind spezifisch für Biliverdin IX α . Die Isoformen I und II sind 21 kDa groß und können neben Biliverdin IX β , auch -IX γ und -IX δ reduzieren. Ein cDNA-Vergleich identifizierte die humane NADPH-Flavin-Reduktase als Biliverdin IX β -Reduktase (Chikuba et al., 1994, Komuro et al., 1996a). Beim Erwachsenen dominieren die Biliverdin-IX α -Formen zu über 90%, beim Föten hingegen die Biliverdin IX β -Reduktasen (Yamaguchi et al., 1994). Eine Domäne der BVR kann als Serin/Threonin/Tyrosin-Kinase fungieren. BVR kann sich im aminoterminalen Bereich an Tyrosin autophosphorylieren und sie kann sowohl Tyrosine als auch Serine im Insulin-Rezeptor-Substrat-1 phosphorylieren. Sie spielt damit eine wichtige Rolle im Insulin-Signalweg und bei der Regulierung der Glucoseaufnahme in die Zelle durch Insulin (Salim et al., 2001, Lerner-Marmarosh et al., 2005). BVR kann ebenfalls Transkriptionsfaktoren, z.B. NF κ B in der MAPK Signalkaskade aktivieren, welche bei der Regulation der HO-1-Expression beteiligt sind (Gibbs and Maines, 2007). Die Gruppe um Maines beobachtete als erste, dass in Anwesenheit von HO-1-Induktoren die BVR in den Nukleus translozieren kann (Maines et al., 2001). Später konnte gezeigt werden, dass die BVR am Häm-Transport in den Nukleus und dadurch an der Regulation der HO-1-Expression beteiligt ist (Tudor et al., 2008). Weiterhin werden der BVR zytoprotektive Eigenschaften zugeschrieben, v.a. als Werkzeug zum Recyceln von Bilirubin (Baranano et al., 2002). Ein erhöhter BVR-Spiegel, der allerdings einhergeht mit erniedrigter Kinase-Aktivität und damit auch erniedrigter Reduktase-Aktivität, konnte im Hippocampus von Alzheimer-Patienten nach deren Tod festgestellt werden (Barone et al., 2011a). Eine posttranslationelle Modifikation der BVR-Struktur bei Alzheimer könnte durch oxidativen und nitrosativen Stress hervorgerufen sein (Barone et al., 2011b). Dieser Effekt könnte zur frühen Diagnose von Alzheimer herangezogen werden.

1.2 Der NO/cGMP-Signalweg

Der NO/cGMP-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulierung des Herz-Kreislaufsystems. Der sekundäre Botenstoff cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) wurde bereits Anfang der 1960er Jahren im Urin von Ratten entdeckt. Später wurde cGMP in fast allen Geweben von Säugetieren identifiziert. Kurz danach wurde die Guanylyl-Cyclase (GC) als cGMP-bildendes Enzym identifiziert (Hardman and Sutherland, 1969, Ishikawa et al., 1969, Schultz et al., 1969, White and Aurbach, 1969).

Auf Grund der Lokalisation werden eine lösliche und eine membranständige GC unterschieden. Letztere wird auch als partikuläre GC (pGC) bezeichnet. Beide GC-Formen werden allerdings unterschiedlich reguliert (Kimura and Murad, 1974a, Kimura and Murad, 1975). Bei der Suche nach Aktivatoren der GC wurde beobachtet, dass Ca^{2+} - und Acetylcholin-Infusionen die cGMP-Spiegel erhöhen können (George et al., 1970, Schultz et al., 1973). Ende der 1970er Jahre wurde NO, welches aus Glyceroltrinitrat freigesetzt wurde, als Aktivator der GC identifiziert. Da zu dieser Zeit NO nur als toxisches Gas bekannt war, wurde die Aktivierung als unphysiologisch erachtet. Furchgott und Zawadzki machten die Entdeckung, dass Acetylcholin eine Erschlaffung der Gefäßmuskulatur hervorrufen kann. Sie führten dies auf einen unbekannten Faktor zurück, den sie als „*endothelium derived relaxing factor*“ (EDRF) bezeichneten (Furchgott and Zawadzki, 1980). Rapoport und Murad konnten zeigen, dass EDRF zu erhöhten cGMP-Spiegeln führt, welche eine Proteinphosphorylierung vermitteln (Rapoport et al., 1983, Rapoport and Murad, 1983). Später konnten Ignarro und Palmer beweisen, dass EDRF und NO identisch sind (Ignarro et al., 1987, Palmer et al., 1987). Bald darauf wurden auch die NO-Synthasen (NOS) entdeckt (Palmer and Moncada, 1989). Man unterscheidet heute die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS), die beide konstitutiv aktiv sind, und die induzierbare Form (iNOS). Alle drei Formen haben gemein, dass sie NO bei der Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin freisetzen (zur Übersicht s. Alderton et al., 2001). Die Identifizierung von NO als physiologisches Signalmolekül war von so großer Bedeutung bei der Erforschung des Herz-Kreislauf-Systems, dass Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad, im Jahr 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden (Nobelprize.org).

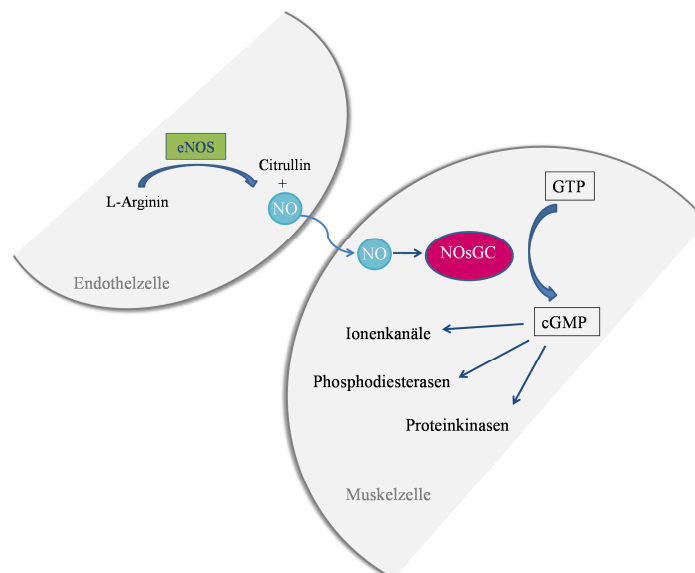


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des NO/cGMP Signalweges. Das durch die NOS gebildete NO diffundiert von der Endothelzelle zu der glatten Muskelzelle der Blutgefäße. Dort aktiviert es die NOsGC, welche GTP zu cGMP umwandelt. cGMP beeinflusst Ionenkanäle, Phosphodiesterasen und Proteinkinasen, woraus die physiologischen Wirkungen resultieren.

1.2.1 Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase

Der wichtigste Rezeptor für NO ist die NOsGC, welche früher auch als lösliche GC bezeichnet wurde. Sie gehört zu der Familie der Nukleotid-Cyclasen, zu der neben der Adenylyl-Cyclase auch die pGC-Form gehören (Hurley, 1998). Die NOsGC wurde in allen Eukaryoten identifiziert, in Geweben von Säugetieren ist sie ubiquitär vorhanden. Sie ist verantwortlich für die Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) zu cGMP. Die physiologischen Wirkungen der NOsGC sind auf die von cGMP zurückzuführen (s. Kapitel 1.2.2). Die NOsGC ist ein Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Bisher wurden vier verschiedene Gene identifiziert, welche für die α_1 - (77 kDa), die α_2 - (82 kDa), die β_1 - (71 kDa) und die β_2 - (70kDa) Untereinheiten codieren (zur Übersicht s. Derbyshire and Marletta, 2012). Die Molekulargewichte beziehen sich auf die humanen Untereinheiten, sie können in verschiedenen Spezies abweichen (UniprotKB, Einträge: Q02108, P33402, Q02153, O75343). Funktionelle Heterodimere werden im Körper aus den Untereinheiten α_1/β_1 und α_2/β_1 gebildet. α_1/β_1 ist ubiquitär in allen Geweben vorhanden, α_2/β_1 wurde vor allem im Gehirn und in der Plazenta lokalisiert (Budworth et al., 1999). Im Gegensatz zu α_1 besitzt α_2 ein PDZ-Bindemotiv, welches an der Interaktion mit einer PDZ-Domäne von PSD-95 beteiligt ist. PDZ steht als Abkürzung für die drei Proteine PSD-95 (*postsynaptic density protein* mit einem Molekulargewicht von 95 kDa), DLG (*discs large*) und ZO-1 (*zona occludens-1*), bei denen diese Domänen zuerst identifiziert wurden (Kennedy, 1995). PSD95 ist ein Membranprotein, welches an Synapsen des Gehirns lokalisiert und u. a. mit der nNOS assoziiert ist. Da α_2/β_1 ebenfalls an Membranen vorliegt, wird vermutet, dass es bei der Signaltransduktion im Gehirn beteiligt ist und durch NO, freigesetzt von der nNOS, aktiviert wird (Russwurm et al., 2001). β_2 wurde in der Niere (von Ratten) und im menschlichen Herzen identifiziert (Yuen et al., 1990, Behrends et al., 1999). Es bildet Homodimere aus, die aber nur in Anwesenheit von Mangan- und nicht von Magnesium-Ionen durch NO aktiviert werden können. Die physiologische Bedeutung ist noch nicht geklärt (Koglin et al., 2001, Behrends and Vehse, 2000). Die Untereinheiten der heterodimeren NOsGC werden funktionell in drei Abschnitte aufgeteilt, die regulatorische-, die Dimerisierungs- und die katalytische Domäne (Wedel et al., 1995). Diese Aufteilung ist für beide Untereinheiten identisch. Die aminoterminalen regulatorischen Domäne wird nach ihrer Fähigkeit Liganden zu binden als *heme nitric oxide/oxygen binding domain* (H-NOX)-Domäne bezeichnet. Die H-NOX-Domäne umfasst ca. 200 Aminosäuren (Iyer et al., 2003, Karow et al., 2005). Dort befindet sich auf der β_1 -Untereinheit, gebunden an das Histidin 105, die prosthetische Hämgruppe (Wedel et al., 1994, Zhao et al., 1998). Sie besteht aus einem fünffach-koordinierten Häm mit einem zweiwertigen Eisen als Zentralatom. Im UV/Vis Spektrum zeigt sie ein Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 431 nm (Soret-Bande) (Gerzer et al., 1981, Stone and Marletta, 1994). Die Oxidation des zentralen Eisenatoms in den dreiwertigen Zustand führt zu einem Verlust der Hämgruppe und damit einer Inaktivierung des Enzyms (Fritz et al., 2011). Bisherige Untersuchungen zu

der H-NOX-Domäne auf der α_1 - und α_2 -Untereinheit konnten keine Beteiligung an der Hämbindung zeigen. Eine Deletion der ersten Aminosäuren (259 bei α_1 und 247 bei α_2) führt weiterhin zu einem funktionellen Enzym (Koglin and Behrends, 2003, Koglin et al., 2002, Kraehling et al., 2011). Eine Funktion konnte dem amino-terminalen Bereich der α -Untereinheiten bisher noch nicht zugeschrieben werden. Eigene Aminosäuresequenzanalysen ergaben, dass die α_1 -Untereinheit an den Positionen 15 eine Aminosäureabfolge enthält, die dem CPF-Motiv der HO-2 entspricht. Die Dimerisierungsdomäne unterteilt sich in die H-NOX-assoziierte (H-NOX-A) Domäne und die „Coiled-coil“(CC)-Region (Iyer et al., 2003, Shiga and Suzuki, 2005). Die H-NOX-A-Domäne wird auch als PAS-Domäne bezeichnet (Ma et al., 2008). Diese ist benannt nach den drei Proteinen PER (*period clock protein*), ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear transporter*) und SIM (*single-minded*), bei denen solch eine Region zuerst identifiziert wurde (zur Übersicht s. Moglich et al., 2009). Die Dimerisierungsdomäne ist, wie der Name schon sagt, essentiell für die Heterodimerisierung von α - und β -Untereinheit und damit für die Ausbildung eines funktionellen Enzyms (Zhou et al., 2004, Rothkegel et al., 2007). Carboxy-terminal schließt sich die katalytische Domäne an. Für die Aktivität der NOsGC sind die katalytischen Domänen beider Untereinheiten notwendig (Winger and Marletta, 2005, Winger et al., 2008). Sie binden das Substrat GTP an der katalytischen Substratbindestelle (Liu et al., 1997). Auf Grund der Größe und der Stabilität ist es bisher noch nicht gelungen eine Kristallstrukturanalyse des ganzen Proteins durchzuführen, so dass über die Quartärstruktur noch keine endgültige Aussage getroffen werden kann. Bisherige Untersuchungen ergaben aber Hinweise darauf, dass sich der amino- und der carboxy-terminale Bereich in räumlicher Nähe zueinander befinden (Haase et al., 2010c).

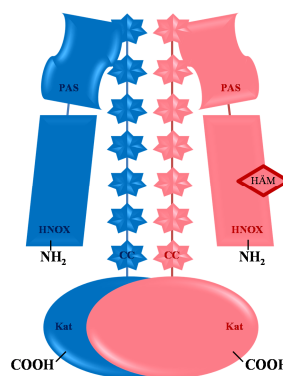


Abbildung 1.4: Strukturmodell der NOsGC. In Blau ist die α -Untereinheit dargestellt und in Rot die β -Untereinheit. Die Abbildung ist modifiziert nach Haase et al., 2010c.

1.2.1.1 Endogene Aktivatoren der NOsGC

NO wird im Körper durch die NOS gebildet. Weiterhin kann es auch aus Nitrit freigesetzt werden, wenn dieses durch Myoglobin oder Hämoglobin reduziert wird (Shiva et al., 2007, Grubina et al., 2007). Nitrit kann durch im Mundraum angesiedelte

Bakterien aus Nitrat gebildet werden, welches durch die Nahrung zugeführt wurde (Lundberg et al., 2008). Die Bildung von NO aus Nitrit ist vor allem unter hypoxischen Bedingungen relevant, wenn die sauerstoffabhängigen NOS nicht mehr aktiv sind. Über die physiologische NO-Konzentration gibt es sehr unterschiedliche Angaben. Neuere Veröffentlichungen lassen auf eine Konzentration zwischen 100 pM und 5 nM schließen (Hall and Garthwaite, 2009). Die Bestimmung *in vivo* ist durch die kurze Halbwertszeit des NOs von etwa 200 ms sehr schwierig (Siervo et al., 2010). Auf Grund seiner neutralen Ladung kann NO durch Membranen diffundieren. Dies ist eine Grundvoraussetzung dafür, dass es von seinem Bildungsort, dem Endothel, zu dem Wirkungsort, der glatten Gefäßmuskulatur, gelangen kann. Dabei kann es Distanzen von bis zu 200 µm zurücklegen (Wood and Garthwaite, 1994). Die physiologischen Effekte von NO sind in erster Linie auf die Aktivierung der NOsGC zurückzuführen (s. Kapitel 1.2.1 und 1.2.2). Die Bindung von NO an das zentrale Eisenatom der prosthetischen Hämgruppe führt zur Ausbildung eines fünffach-koordinierten Eisen-Nitrosyl-Komplexes (Stone et al., 1995), erkennbar an einer bathmochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 431 nm zu der Wellenlänge 398 nm. Die NO-Bindung resultiert in einer Aktivitätssteigerung der angereinigten NOsGC um mehr als das hundertfache (Stone and Marletta, 1994). Eine hemmende Wirkung übt es durch die Konkurrenz mit O₂ auf die Cytochrom C-Oxidase, ein zentraler Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, aus (Brown and Cooper, 1994, Cleeter et al., 1994). Durch die Bindung an Häm kann es auch inhibitorisch auf die HO wirken (Juckett et al., 1998, Wang et al., 2003). Pathologische Wirkung besitzt NO durch seine Radikalfunktion und dadurch, dass es zu Peroxynitrit oxidiert werden kann, welches Proteine nitrosyliert.

Neben NO kann auch CO die NOsGC aktivieren. CO bindet ebenfalls an das zentrale Eisenatom der prosthetischen Hämgruppe. Es bildet allerdings im Gegensatz zu NO einen 6-fach koordinierten Komplex aus (Stone and Marletta, 1995). Das Absorptionsmaximum verschiebt sich nach der Bindung auf 423 nm. Die Aktivitätssteigerung ist mit einem Faktor von ca. 4 deutlich geringer als die von NO (Stone and Marletta, 1994). Zusätzlich vermag CO die Wirkung von NO zu potenzieren. Letzteres könnte über eine allosterische Bindestelle an der NOsGC geschehen (Cao et al., 2000). Es gibt allerdings auch Hinweise, dass dieser Effekt konzentrationsabhängig ist und CO, in niedrigen Konzentrationen, die NO-Aktivierung abschwächt und es nur in hohen Konzentrationen die NO-Wirkung potenziert (Ingi et al., 1996).

1.2.1.2 Modulatoren der NOsGC

Die NOsGC kann auf verschiedene Arten moduliert werden, so kann sie nicht nur aktiviert, sondern auch stimuliert oder inhibiert werden. Neben den bereits erwähnten endogenen Aktivatoren können auch synthetische Substanzen die NOsGC aktivieren. NO- und CO-Gase werden therapeutisch eingesetzt. Auf Grund ihrer toxischen Eigenschaften ist eine exakte Dosierung immens wichtig (s. zur Übersicht Motterlini

and Otterbein, 2010). NO- bzw. CO-freisetzende Substanzen werden deshalb bevorzugt. Die erste bekannte NO-freisetzende Substanz war das Glyceroltrinitrat (Murrell, 1879). Es gehört wie auch das Isosorbid-endo-5-mononitrat (ISMN), das Isosorbid-2,5-dinitrat, das Pentaerythryltetranitrat (PETN) und das Molsidomin zu den organischen Nitraten (s. zur Übersicht Miller and Megson, 2007). Diese werden zur Therapie der stabilen Angina-Pectoris und des akuten Koronarsyndroms eingesetzt. Die Freisetzung des NOs aus der Nitratgruppe ist immer noch nicht vollständig geklärt. Außer bei Molsidomin, bei dem NO nicht-enzymatisch freigesetzt wird, wird vermutet, dass die NO-Freisetzung enzymatisch unter der Beteiligung der mitochondrialen Aldehyddehydrogenase-2 geschieht (Chen et al., 2002b, Wenzl et al., 2011). Die pharmakologische Wirkung tritt vor allem an venösen Gefäßen und den Koronararterien ein. Durch die hervorgerufene Vasodilatation kommt es zu einer Vorlastsenkung und dadurch zu einer verringerten Wandspannung am Herzen. Ein großes Problem der NO-freisetzenden Pharmaka ist neben dem, zu Beginn der Therapie einsetzenden, Nitratkopfschmerz die Nitrattoleranz, welche wahrscheinlich durch einen Mangel an mitochondrialer Aldehyddehydrogenase hervorgerufen wird (Chen et al., 2002b). Diese äußert sich in einer Abschwächung der pharmakologischen Wirkung, die allerdings nach einem dosisfreien Intervall wieder hergestellt werden kann. Zu experimentellen Zwecken wird der NO-Donator Diethylamin/NO (DEA/NO) eingesetzt. In Anwesenheit von Wasser zerfällt es und setzt zwei Moleküle NO frei. Die Halbwertszeit von DEA/NO beträgt bei 37 °C etwa 2 min (Morley et al., 1993).

Vor ungefähr 10 Jahren wurden CO-freisetzende Pharmaka, sogenannte CORMs (*CO releasing molecules*) entdeckt (Motterlini et al., 2002). Meistens handelt es sich um Metall-Carbonyl-Komplexe (hauptsächlich Mangan- und Ruthenium-Verbindungen) oder Bor-Verbindungen (Motterlini et al., 2005). Die Vielzahl an Verbindungen unterscheidet sich vor allem in der Löslichkeit und in der Art der CO-Freisetzung. Mittlerweile wurden auch photoaktivierbare CORMs (PhotoCORMs) entwickelt, die z.B. bei der photodynamischen Therapie Einsatz finden könnten (Niesel et al., 2008). Die vasodilatatorischen Eigenschaften der CORMs sind, entsprechend den Wirkungen von CO auf die NOsGC, nicht so groß wie die der NO-freisetzenden Substanzen. Auf Grund der antiinflammatorischen und antibakteriellen Effekte der CORMs, ist ein Einsatz neben der Blutdruckregulierung vielversprechend (s. zur Übersicht Motterlini et al., 2012).

Die Aktivierung durch NO oder CO setzt das Vorhandensein der prosthetischen Hämgruppe voraus. Oxidativer Stress kann die Oxidation des Eisenatoms bewirken, was zu einem Verlust der Hämgruppe führen kann (Fritz et al., 2011). Weiterhin kann freies NO zu Peroxynitrit oxidiert werden, woraus eine Reduktion des NO-Gehaltes resultiert. Dies kann zu einer drastischen Wirkverminderung der o.a. Substanzen führen. Deshalb ist die Entdeckung von NO/CO- und häm-unabhängigen NOsGC-Aktivatoren von großer therapeutischer Bedeutung. Bereits 1982 wurde entdeckt, dass PPIX die

NOsGC zu aktivieren vermag (Ignarro et al., 1982). PPIX ist die eisenfreie Form von Häm *b*. Auf Grund der Phototoxizität hat es aber nie therapeutische Verwendung gefunden. Anders sieht es mit neueren NOsGC-Aktivatoren aus, die sich mittlerweile in klinischen Studien befinden. Cinaciguat (Bay 58-2667) der Fa. Bayer wird untersucht zur Behandlung akuter Herzinsuffizienz und zu Ataciguat (HMR-1766) der Fa. Sanofi Aventis laufen Studien zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (ClinicalTrials.gov). Beide Substanzen können nicht nur die hämhaltige, sondern in erhöhtem Maße die oxidierte bzw. hämfreie Form der NOsGC aktivieren (Schmidt et al., 2009, Stasch et al., 2002). Kristallstruktur-Untersuchungen der H-NOX-Domäne aus *Nostoc sp.* in Anwesenheit von Cinaciguat lassen den Schluss zu, dass dieses anstelle der Hämgruppe an der Hämbindetasche der NOsGC bindet (Martin et al., 2010). Darüber hinaus kann Cinaciguat die Ubiquitynylierung und den daraus resultierenden proteosomalen Abbau der NOsGC, nach Verlust deren Hämgruppe, verhindern (Meurer et al., 2009).

Der erste Vertreter der NOsGC-Stimulatoren war das Benzylindazol-Derivat YC-1, später als Lificiguat bezeichnet. YC-1, wie auch die anderen Vertreter dieser Gruppe, kann sowohl die NOsGC aktivieren als auch die Aktivierbarkeit durch NO potenzieren. Die schwache Aktivierbarkeit durch CO erreicht in Anwesenheit von YC-1 die von NO. Vermutet wird, dass YC-1 über eine allosterische Bindestelle seine Wirkung ausübt, wodurch die Dissoziation der Liganden von der Hämgruppe reduziert wird (Friebe et al., 1996, Friebe et al., 1998, Friebe and Koesling, 1998). YC-1 führt nicht nur zu einer Vasorelaxation (Mulsch et al., 1997) sondern auch zu einer Inhibition der Thrombozytenaggregation (Ko et al., 1994). Mittlerweile sind durch die Fa. Bayer mehrere neuere Vertreter (z.B. Bay 41-2272, Bay 63-2521) dieser Gruppe entwickelt worden. Der genaue Wirkmechanismus konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Untersuchungen mit Bay 41-2272, welches strukturell verwandt ist mit YC-1, deuten sowohl auf eine mögliche Bindung im Bereich der Cysteine 238 und 243 auf der α_1 -Untereinheit (Becker et al., 2001, Stasch et al., 2001) als auch im Bereich der Hämbinderegion hin (Denninger et al., 2000). Riociguat (Bay 63-2521) hat unter dem Markennamen Adempas[®] in den USA und in Kanada die Zulassung zur Behandlung der chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie erhalten.

Die NOsGC kann kompetitiv durch Protoporphyrinderivate wie z.B. Zinkprotoporphyrin IX gehemmt werden. Dies entsteht im Körper, wenn bei der Hämsynthese kein freies Eisen zur Verfügung steht. Ein selektiver, nicht-kompetitiver Inhibitor ist das Chinoxalinderivat ODQ (Garthwaite et al., 1995). Es führt zu einer Verschiebung der Soret-Bande von 431 nm zu 393 nm, was auf eine Oxidation des zweiwertigen Eisenatoms der Hämgruppe zurückzuführen ist (Schrammel et al., 1996). Dieses ist nicht mehr durch NO aktivierbar. In hohen Dosen kann ODQ ebenfalls das Häm von anderen Hämoproteinen wie Hämoglobin oxidieren (Zhao et al., 2000). Andere Effektoren des NO/cGMP Signalweges bleiben durch ODQ unbeeinflusst,

weshalb ODQ v.a. für Untersuchungen der Aktivierbarkeit der NOsGC herangezogen werden kann.

1.2.2 Das cGMP-Effektorsystem

cGMP ist ein cyclisches Nukleotid und fungiert als sekundärer Botenstoff. Diese dienen als Signalüberträger zwischen Zellen und Effektorsystemen. Die Zielstrukturen von cGMP sind cGMP-abhängige-Ionenkanäle, -Proteinkinasen und -Phosphodiesterasen (vgl. Abbildung 1.3). Diese vermitteln die eigentlichen physiologischen Wirkungen, wie Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation und Neurotransmission. Die Ionenkanäle umfassen verschiedene Kationenkanäle, die auch als CNG-(*cyclic nucleotide-gated*)-Kanäle bezeichnet werden. Sie spielen eine wichtige Rolle sowohl in cGMP- als auch in cAMP-Signalwegen. cAMP steht für cyclisches-3',5'-Adenosinmonophosphat. Es wird durch die Adenyl-Cyclase gebildet und fungiert wie cGMP als sekundärer Botenstoff. CNG-Kanäle sind nicht spezifisch für ein- (Na^+ , K^+) oder mehrwertige (Ca^{2+})-Kationen. cGMP spielt eine wichtige Rolle bei der olfaktorischen Signalweiterleitung und bei der Phototransduktion. Diese wird durch einen Natriumkanal an der Retina vermittelt (Yau and Baylor, 1989). Über einen Ca^{2+} -Kanal wird die Geißeltätigkeit von Spermien reguliert (Wiesner et al., 1998). Außer im Hoden wurden CNG-Kanäle auch in der Niere und am Herzen gefunden (Biel et al., 1994). Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK), auch bekannt als Proteinkinase G (PKG), sind Serin/Threonin-Kinasen, welche ihre Zielproteine phosphorylieren können. In Säugetieren sind bisher zwei Formen beschrieben, die cGKI und die cGKII. Die cGKI führt über eine Dephosphorylierung der leichten Myosinkette an der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Vasodilatation (Pfeifer et al., 1998). In Thrombozyten ist sie an der Hemmung der Aggregation beteiligt. Die cGKII ist vor allem in der Niere zu finden. Durch *Knock-out* Versuche an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die cGKII die Ausschüttung von Renin aus renalen juxtaglomerulären Zellen inhibiert (Wagner et al., 1998). Phosphodiesterasen (PDE) regulieren den cGMP-Gehalt in der Zelle, da sie cGMP zu 5'-GMP hydrolysieren. Nach derzeitigem Wissensstand kommt 5'-GMP keine physiologische Funktion zu, es wird aber zur Regenerierung von GTP verwendet. Die PDEs werden zu 11 Familien zusammengefasst. Die PDEs-5, -6 und -9 sind spezifisch für cGMP, während die PDEs -1, -2, -3, -10 und -11 neben cGMP auch cAMP hydrolysieren können (Omori and Kotera, 2007). Die Aktivität der PDEs selbst können über den Gehalt an zyklischen Nukleotiden geregelt werden. So besitzt die PDE-5 eine Proteinkinase A- und PKG-abhängige-Phosphorylierungsstelle, die beteiligt sind bei der Aktivierung der PDE (Corbin et al., 2000). Die PDE-5 wird als pharmakologische Zielstruktur verwendet. Spezifische PDE-5-Inhibitoren werden bei der erektilen Dysfunktion und bei der pulmonalen arteriellen Hypertonie eingesetzt.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die HOs regulieren durch ihre hämabbauende Wirkung den Häm Spiegel im Körper. Neben der Reduktion des prooxidativen Häms haben die bei der Reaktion entstehenden Produkte Eisen, CO, Biliverdin und das nachfolgend entstehende Bilirubin viele physiologische Eigenschaften in Bezug auf oxidativen Stress und auf die Regulierung des Herz-Kreislaufsystems. Das Augenmerk dieser Arbeit lag auf den Untersuchungen der physiologischen Unterschiede der HO-Isoenzyme und deren Wechselwirkungen mit der NOsGC, welche in vielerlei Hinsicht Verknüpfungspunkte mit der HO besitzt. Die Expression der Enzyme im eukaryotischen System bot den Vorteil der genauen Untersuchung der Rolle der einzelnen Komponenten und deren Wechselwirkungen.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen durch die Arbeit untersucht werden:

- Die Interaktion der HO mit der CPR ist für die Enzymaktivität essentiell. Hierfür ist ein intakter Carboxy-Terminus der HO Voraussetzung. Gibt es spezifische Unterschiede der Isoenzyme bei der CPR-Interaktion und inwiefern spielt der Oligomerisierungsgrad eine Rolle bei der Stabilität des Carboxy-Terminus der HO?
- Die hämregulatorischen Motive der HO-2 sind essentiell für physiologische Aufgaben der HO-2, die diese von ihrem Isoenzym der HO-1 unterscheiden. Besitzen diese CPF-Motive Einfluss auf die CPR-Interaktion und auf die Translokation nach Inkubation mit Hämin?
- Bei Untersuchungen der Aminosäuresequenz der NOsGC konnte ein CPF-Motiv in der α_1 -Untereinheit der NOsGC identifiziert werden. Könnte dieses ein hämregulatorisches Motiv darstellen und in wie weit könnte dies Einfluss auf die Enzymaktivität der NOsGC besitzen?
- Untersuchungen *in vivo* zeigen die Beeinflussung des NO/cGMP Signalweges durch die HO. Der genaue Mechanismus ist noch nicht hinreichend geklärt. Zeigt die gemeinsame Expression von HO und NOsGC im Sf9-System eine Beeinflussung der Enzymaktivität und -expression der NOsGC *in vitro*?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|---|----------------------------------|
| [α - ³² P]-GTP | Hartmann Analytic (Braunschweig) |
| Agar-Kolbe I | Applichem (Darmstadt) |
| Agarose niedriger EEO | Applichem (Darmstadt) |
| Albumin Fraktion V | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Aluminiumoxid | MP Biomedicals (Eschwege) |
| Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Amoniumperoxodisulfat | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Avidin | IBA BioTAGnology (Göttingen) |
| Benzamidin-HCl-Hydrat | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Biliverdin-HCl | Frontier Scientific (Logan, USA) |
| Bluo-Gal | Invitrogen (Darmstadt) |
| Bromphenolblau | Merck (Darmstadt) |
| Calciumchlorid | Merck (Darmstadt) |
| cGMP | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Chloroform | J.T. Baker (Deventer, Holland) |
| cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail | Roche (Mannheim) |
| Coomassie Brilliantblau G250 | Merck (Darmstadt) |
| Desthiobiotin | IBA BioTAGnology (Göttingen) |
| di- Natriumhydrogenphosphat | Merck (Darmstadt) |
| Diethylamin NONOate Natriumsalz-Hydrat | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Dimethylsulfoxid | Applichem (Darmstadt) |
| DNA Marker: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| dNTP Mix 10 mM | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| DTT | Applichem (Darmstadt) |
| EDTA-di-Natriumsalz-Dihydrat | Applichem (Darmstadt) |
| Essigsäure 96 % | Merck (Darmstadt) |
| Ethanol | Applichem (Darmstadt) |
| Ethanol 96 % | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Ethidiumbromid | Carl Roth (Karlsruhe) |

| | |
|--|------------------------------|
| FBS | PAA (Cölbe) |
| Gas und Gasgemische | Westfalen (Münster) |
| Gentamycin Lösung (50 mg/ml) | Gibco–Invitrogen (Darmstadt) |
| Glucose | Merck (Darmstadt) |
| Glucose-6-phosphat dehydrogenase Typ IX | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Glucose-6-phosphat di-Natriumsalz-Hydrat | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Glycerintrinitrat 5 % | Pharmapol (Dägeling) |
| Glycerol | Applichem (Darmstadt) |
| Glycin | Applichem (Darmstadt) |
| GTP | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| HABA | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Hefeextrakt | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Hämin | Fluka (Buchs, Schweiz) |
| IBMX | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| IPTG | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Isopropanol | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Kaliumacetat | Merck (Darmstadt) |
| Kaliumchlorid | Merck (Darmstadt) |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Kanamycin Lösung (50 mg/ml) | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Kreatinphosphat di-Natriumsalz-Tetrahydrat | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Leptomycin B | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat | Merck (Darmstadt) |
| β-Mercaptoethanol | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Milchpulver | Carl Roth (Karlsruhe) |
| MTT | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Myoglobin | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| NADPH-Tetranatriumsalz | Applichem (Darmstadt) |
| Natriumacetat | Applichem (Darmstadt) |
| Natriumchlorid | Applichem (Darmstadt) |
| Natriumdithionit | Merck (Darmstadt) |
| Natriumhydroxid | Merck (Darmstadt) |
| Natriumnitrit | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| ODQ | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| ortho-Phosphorsäure (99 %) | Merck (Darmstadt) |
| Oxalsäure | Merck (Darmstadt) |
| Penicillin/Streptomycin (100x) | PAA (Cölbe) |

| | |
|--|--------------------------------|
| Perchlorsäure | Merck (Darmstadt) |
| Polyethylenimin | Polysciences (Warrington, USA) |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Protein Marker: PageRuler™ prestained | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Roti® Quant | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Rotiphorese® Gel 30 | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Salzsäure 37 % | Merck (Darmstadt) |
| SDS | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Stickstoff, flüssig | Linde (Pullach) |
| <i>Strep</i> -Tactin® Superflow® high capacity | IBA BioTAGnology (Göttingen) |
| TEA/HCl | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| TEMED | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Tetracyclin-HCl | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Tris | Applichem (Darmstadt) |
| Trypanblau | Merck (Darmstadt) |
| Trypsin/EDTA | PAA (Cölbe) |
| Trypton | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Tween® 20 | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Xylencyanol | Carl Roth (Karlsruhe) |
| Zinkacetat-Dihydrat | Merck (Darmstadt) |

3.1.2 Reagenziensysteme

| | |
|---|---|
| Cellfectin® II Reagenz | Invitrogen (Darmstadt) |
| Gelfiltrations-Kalibrationskit LMW (low molecular weight) | GE Healthcare (Freiburg) |
| Lipofectamine® LTX Plus Reagenz | Invitrogen (Darmstadt) |
| Lumi-Light ^{Plus} Western-Blotting Kit | Roche (Mannheim) |
| HiPure Plasmid Maxi Prep® Kit | Invitrogen (Darmstadt) |
| QuickChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit | Agilent Technologies (Böblingen) |
| TOPO®-TA Klonierungsreagenziensystem (Cloning Kit) | Invitrogen (Darmstadt) |
| Phusion™ High Fidelity PCR Kit | FINNZYMES OY (Espoo, Finnland) (vertrieben durch New England Biolabs) |

3.1.3 Lösungen, Puffer und Medien

Acryl-/Bisacrylamid-Lösung: Rotiphorese[®] Gel 30

Annealing-Puffer (2x-STE-Puffer): 20 mM Tris, pH 7,5-8,0, 0,1 M NaCl, 2 mM EDTA

Blocking-Puffer: 5 % (w/v) Milchpulver in TBST

Bradford-Reagenz: Roti[®]Quant verdünnt in Reinstwasser (1:5)

Coomassie Färbelösung: 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250; 5 % (w/v) Aluminiumsulfat-Hexadecahydrat; 10 % (v/v) Ethanol 96 %; 2 % (w/v) ortho-Phosphorsäure (99 %)

Coomassie Waschlösung: 10 % (v/v) Ethanol 96 %; 2 % (w/v) ortho-Phosphorsäure (99 %)

DMEM-High Glucose Medium (4,5 g/l): PAA (Cölben)

6x DNA-Ladepuffer: 10 mM Tris; 60 mM EDTA; 60 % (v/v) Glycerol; 0,03 % (w/v) Bromphenolblau; 0,03 % (w/v) Xylencyanol; pH 7,6

Gelfiltrationspuffer: 50 mM TEA; 0,25 M Natriumchlorid; pH 8,0

LB-Agar: LB Medium; 1,5 % Agar-Agar (w/v)

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % Natriumchlorid; pH 7,0

Lysis-Lösung für MTT-Test: 99,4 ml DMSO; 0,6 ml Essigsäure 100%; 10 g SDS

Minipräparation-Lösung I: 50 mM Glucose; 25 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8,0

Minipräparation-Lösung II: 0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS

Minipräparation-Lösung III: 3 M Kaliumacetat; 12 % (v/v) Essigsäure 96 %

MTT-Lösung: 5 mg/ml MTT gelöst in warmem PBS

PBS: 1,7 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 5,2 mM di-Natriumhydrogenphosphat; 0,15 M Natriumchlorid; pH 7,4

PBS-Mg-Puffer: 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat; 2 mM Magnesiumchlorid; pH 7,4

PEI-Lösung: Lösung in deionisiertem Wasser (1 µg/µl); pH neutralisiert mit HCl, sterilfiltriert und aliquotiert bei -20 °C eingefroren

Ponceau S Färbelösung: 0,5 % (w/v) Ponceau S; 1 % (v/v) Essigsäure 96 %

SDS-PAGE Laufpuffer (10x): 0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS; pH 8,3-8,8

SDS-PAGE Probenpuffer (2x): 0,15 M Tris; 1,2 % (w/v) SDS; 30 % (v/v) Glycerol; 15 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,0018 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8

SDS-PAGE Sammelgelpuffer (2x): 0,25 M Tris; 0,2 % (w/v) SDS pH 6,8

SDS-PAGE Trenngelpuffer (4x): 1,5 M Tris; 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8

SF-900 II SFM Medium: Invitrogen (Darmstadt)

SOC-Medium: 2 % (w/v) Trypton; 0,55 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM Natriumchlorid; 10 mM Kaliumchlorid; 10 mM Magnesiumchlorid; 10 mM Magnesiumsulfat; 20 mM Glucose

Strep-Elutionspuffer für HO/hBVR-Anreinigung: 0,1 M Tris; 0,5 M Natriumchlorid; 1 mM EDTA; 1 mM Benzamidin; 2,5 mM D-Desthiobiotin; pH 8,0

Strep-Elutionspuffer für NOsGC-Anreinigung: 0,1 M Tris; 1 M Natriumchlorid; 1 mM EDTA; 1 mM Benzamidin; 10 mM DTT; 2,5 mM D-Desthiobiotin; pH 8,0

Strep-Regenerationspuffer: 0,1 M Tris; 0,15 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM HABA; pH 8,0

Strep-Waschpuffer für HO/hBVR-Anreinigung: 0,1 M Tris; 0,5 M Natriumchlorid; 1 mM EDTA; 1 mM Benzamidin pH 8,0

Strep-Waschpuffer für NOsGC-Anreinigung: 0,1 M Tris; 1 M Natriumchlorid; 1 mM EDTA; 1 mM Benzamidin; 10 mM DTT; pH 8,0

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 7,6

TBST (10x): 0,1 M Tris; 1,5 M Natriumchlorid; 1 % (v/v) Tween[®] 20

TEA-Lysispuffer: 50 mM TEA; 1 mM EDTA; [10 mM DTT]; pH 7,4

Transferpuffer (10x): 0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 0,2 % (w/v) SDS; pH 8,3

Transposition-Agarplatten: LB-Agar; Kanamycin 50 µg/ml; Gentamycin 7 µg/ml; Tetracyclin 10 µg/ml; Bluo-Gal 100 µg/ml; IPTG 40 µg/µl

Trypanblau-Lösung: 0,4 % (w/v) Trypanblau in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung

3.1.4 Stammlösungen

Ampicillin: 100 mg/ml in Reinstwasser

Bluo-Gal: 200 mg/ml in Dimethylformamid

Cinaciguat: 10 mM in DMSO 100%

DEA/NO: 10 mM in 10 mM NaOH

Hämin für HO-Assay: 10 mM in 0,1 M NaOH

Hämin für Translokationsversuche: 10 mM in DMSO

IPTG: 24 mg/ml in Reinstwasser

ODQ: 1 mM in DMSO 25%

Tetracyclin-HCl: 10 mg/ml in Reinstwasser

3.1.5 Gele

DNA-Agarosegel: 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid

SDS-PAGE Trenngel: 0,1 % (w/v) SDS; 10 % Acryl-/Bisacrylamid-Lösung; 375mM Tris; 0,1 % (v/v) TEMED; 0,1% Amoniumperoxodisulfat; pH 8,8

SDS-PAGE Sammelgel: 0,1 % (w/v) SDS; 6 % Acryl-/Bisacrylamid-Lösung; 125mM Tris; 0,06 % (v/v) TEMED; 0,12% Amoniumperoxodisulfat; pH 6,8

3.1.6 Vektoren

| | |
|--|------------------------|
| pCR [®] 2.1-TOPO [®] | Invitrogen (Darmstadt) |
| pFastBac [™] -1 | Invitrogen (Darmstadt) |
| pECFP-C1 | Clontech (Heidelberg) |
| pEGFP-C1 | Clontech (Heidelberg) |
| pEYFP-C1 | Clontech (Heidelberg) |
| pEYFP-N1 | Clontech (Heidelberg) |
| pUC 19 | Invitrogen (Darmstadt) |

3.1.7 Primer und Oligonukleotide

| | |
|--|---|
| HO1ΔC266_sense (P367) | 5'-cac ccg ctc cca ggc <u>tta</u> gct tct ccg atg g-3' |
| HO1ΔC266_antisense (P368) | 5'-cca tcg gag aag <u>cta</u> agc ctg gga gcg ggt g-3' |
| CPR_HindIII ohne Stop_sense (P353) | 5'-ctc cct gga cgt ggg aag ctt ggg gcc tgc ctg c-3' |
| CPR_HindIII ohne Stop_antisense (P354) | 5'-gca ggc agg ccc caa gct tcc cac gtc cag gga g-3' |
| HO1 H25A_sense (P349) | 5'-gcc acc aaa gag gtg <u>gcc</u> acc cag gca gag aa- 3' |
| HO1 H25A_antisense (P350) | 5'-ttc tct gcc tgg gtg <u>gcc</u> acc tct ttg gtg gc-3' |
| HO2 H45A_sense (P351) | 5'-gaa ggg acc aag gaa gca <u>gcc</u> gac cgg gca-3' |
| HO2 H45A_antisense (P352) | 5'-tgc ccg gtc <u>ggc</u> tgc ttc ctt ggt ccc ttc-3' |
| HO2ΔC289_sense (P347) | 5'-cct tcc gaa cag cta <u>tgt</u> gag tgc tga gga agc cca g-3' |

| | |
|---|--|
| HO2ΔC289_antisense (P348) | 5'-ctg ggc ttc ctc agc <u>act_cac</u> ata gct gtt cgg aag g-3' |
| NotI_ <i>Strep</i> _HO1_HS_sense (P333) | 5'-gcg gcc gca cca tgg cta gcg cat gga gtc atc ctc aat tcg aaa aat ccg gaa tgg agc gtc cgc aag ccg ac-3' |
| HS-HMOX1_sense (P256) | 5'-ccc agc acc ggc cgg atg gag-3' |
| HS-HMOX1_antisense (P257) | 5'-ttc agt gcc cac ggt aag gaa gc-3' |
| HS-HMOX2_sense (P258) | 5'-cag agg agc gag acg agc aag aac-3' |
| HS-HMOX2_antisense (P259) | 5'-agg ggt agg cca gtg gtc agt cg-3' |
| <i>Strep</i> -hBVR_sense (P 334) | 5'-acc atg gct agc gca tgg agt cat cct caa ttc gaa aaa tcc gga atg aat gca gag ccc gag agg-3' |
| hBVR_anti_intern_zwNotundEco (P335) | 5'- tgc aag act ttt cct ttc tgc tca-3' |
| anti_ <i>Strep</i> _HO2-Pau_Apa (P322) | 5'-cca gag ttc ttt ttt tct gac tgc tct acc ccc tct gag gtt tcc act tcc gct gac att ccg gat ttt tgc aat tga gga tga ctc cat gcg cta gcc atg gtg-3' |
| sense_ <i>Strep</i> _HO2-Pau_Apa (P321) | 5'-cgc gca cca tgg cta gcg cat gga gtc atc ctc aat tcg aaa aat ccg gaa tgt cag cgg aag tgg aaa cct cag agg ggg tag acg agt cag aaa aaa aga act ctg ggg cc-3' |
| senseC282SHSHMOX2 (P302) | 5'-gga ggg cag cag <u>ctc_tcc</u> ctt ccg aac-3' |
| antiC282SHSHMOX2 (P303) | 5'-gtt cgg aag <u>gga_gag</u> ctg ctg ccc tcc-3' |
| senseC265SHSHMOX2 (P300) | 5'-gac atg cgt aaa <u>tcc</u> cct ttc tac gct gc-3' |
| antiC265SHSHMOX2 (P301) | 5'-gca gcg tag aaa ggg <u>gat</u> tta cgc atg tc-3' |
| hBVR_sense (P285) | 5'-gaa gag acc aag atg aat gca gag-3' |
| hBVR_anti (P286) | 5'-tgc tac atc acc tcc tcc tct tac-3' |
| senseC15SHSsGCa1 (P299) | 5'-gat cac agg aga <u>gtc_tcc</u> ttt ctc ctt act gg-3' |
| antiC15SHSsGCa1 (P304) | 5'-cca gta agg aga aag <u>gag_act</u> ctc ctg tga tc-3' |
| senseC15SRNsGCa1 (P313) | 5'- gat cac ggg gga <u>gtc_tcc</u> ttt ctc ctt act gg -3' |
| antiC15SRNsGCa1 (P314) | 5'- cca gta agg aga aag <u>gag_act</u> ccc ccg tga tc-3' |

Alle Primer und Oligonukleotide wurden von der Fa. Biomers (Ulm) bezogen. Die Nummern in Klammern beziehen sich auf eine interne Beschriftung der Arbeitsgruppe. Die unterstrichenen Basen bilden die neuen Triplets nach der Mutagenese. Die zur Klonierung der HOs und hBVR verwendete cDNA (FirstChoice® PCR ready human placenta cDNA) wurde von der Fa. Ambion, Austin, USA bezogen.

3.1.8 Enzyme

| | |
|--|-----------------------------|
| Kreatinkinase | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Lysozym | Fluka (Buchs, Schweiz) |
| <i>Pfu</i> -turbo DNA Polymerase | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| RNase | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| Shrimp Alkaline Phosphatase | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| <i>Taq</i> DNA Polymerase | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| T4 DNA Ligase | Fermentas (St. Leon-Rot) |
| Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt/Main) oder von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. | |

3.1.9 Zelllinien

3.1.9.1 Prokaryotische Zellen

dam-/dcm- kompetente *E.coli* (New England Biolabs; Frankfurt/Main)

ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10) Tet^S endA1 rspL136 (Str^R) dam13::Tn9 (Cam^R) xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2

Max Efficiency[®] DH10Bac[™] kompetente Zellen (Invitrogen; Darmstadt)

F- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1 endA1 araD139* $\Delta(ara, leu)7697$ *galU galK λ -rpsL nupG/bMON14272/pMON7124*

One Shot[®] TOP 10 kompetente Zellen (Invitrogen; Darmstadt)

F- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1 araD139* $\Delta(ara, leu)7697$ *galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

3.1.9.2 Eukaryotische Zellen

Sf9-Zellen (Invitrogen, Darmstadt)

HEK293-Zellen (DSMZ, Braunschweig)

3.1.10 Antikörper

| Name | Ursprung | Verdünnung | Besonderheiten/Immunogen | Firma |
|---------------------|-----------|------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| anti- β_1 sGC | Kaninchen | 1:4000 | Polyklonal, Polypeptid AS 605-619 | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |

| | | | | |
|-----------------------------|-----------|--------|--|---|
| anti- α_1 sGC | Kaninchen | 1:5000 | Polyklonal, Polypeptid AS 673-690 | Sigma-Aldrich (Taufkirchen) |
| anti-HO-1 | Kaninchen | 1:5000 | Polyklonal; gereingte rekombinant hergestellte HO-1 aus <i>E.coli</i> (AS 1-261) | Stressgen (Enzo Lifescience, Lörrach) |
| anti-HO-2 | Kaninchen | 1:5000 | Polyklonal; gereingte Rattenhoden HO-2 | Stressgen (Enzo Lifescience, Lörrach) |
| anti-CPR | Kaninchen | 1:1000 | Polyklonal, gereingte Rattenleber NADPH-Cytochrom P450 Reduktase | Abcam (Cambridge, England) |
| anti-rabbit IgG, HRP linked | Ziege | 1:2000 | Angereinigt | Cell signaling (New England Biolabs, Frankfurt) |

3.1.11 Geräte und Hilfsmittel

| Produkt | Name | Firma |
|--|--------------------------------------|---|
| Absaugsystem Zellkultur | Vacusaft comfort | Integra Bioscience (Fernwald) |
| Analysenwaage | BP 210D | Sartorius (Göttingen) |
| Argon-Laser | MELLES-GRIOT® | Melles-Griot (Carlsbad, Kalifornien, USA) |
| Autoklav | DX-90 | Systec (Wettenberg) |
| Blotting-Papier | Whatman Chromatography Paper 3MM Chr | GE Healthcare (Freiburg) |
| Chromatographiesäulen für Größenausschluss, einweg | PD-10 Columns, pre-packed | GE Healthcare (Freiburg) |
| Chromatografie-Leersäulen | Poly-Prep® Chromatography Columns | Bio-Rad (München) |
| CO ₂ -Brutschrank | MCO-18 AIC | SANYO Biomedical über Ewald Innovationstechnik (Bad Nenndorf) |
| ECL Dokumentationsanlage | ChemiLux | Intas (Göttingen) |
| Erlenmeyerkolbenflaschen für | Polycarbonat Erlenmeyer | Corning (Lowell, USA) |

| | | |
|-------------------------------------|--|--|
| Sf9-Zellen | flask with vent cap | |
| FPLC-Anlage | ÄKTApurifier™ | GE Healthcare (Freiburg) |
| Gasmischer für Mikroskop | 3GF-Mixer | Okolab (Neapel, Italien) |
| Gefrierschrank, -20 °C | GNP 3376 | Liebherr (Ochsenhausen) |
| Gefrierschrank, -80 °C | | GFL (Burgwedel) |
| Gefriertruhe, -152 °C | Ultra Tiefkühltruhe MDF 1156 | SANYO Biomedical über Ewald Innovationstechnik (Bad Nenndorf) |
| Geldokumentationssystem | Gel iX Imager | Intas (Göttingen) |
| Gelfiltrationssäule | Superdex™ 200 10/300 GL | GE Healthcare (Freiburg) |
| Hybridisierungssofen | APT Line | Biometra (Göttingen) |
| Hypoxie-Brutschrank | MCO-18M | SANYO Biomedical über Ewald Innovationstechnik (Bad Nenndorf) |
| Imaging Platten | Imaging Plate 24 CG | zell-kontakt (Nörten-Hardenberg) |
| Inkubationskammer für Mikroskop | Microscope enclosure H201 Temperature controller H201-T CO ₂ controller DGCO2BX | Okolab (Neapel, Italien) |
| Inkubationsschrank 37 °C | Kelvitron®t | Thermo Scientific Heraeus® (Hanau) |
| Inkubationsschrank für Sf9-Zellen | StabiliTherm™ | Thermo Scientific Heraeus® (Hanau) |
| inverses, konfokales Lasermikroskop | Nikon eclipse Ti mit A1 System | Nikon Europa (Kingston, England) |
| Kombimischer | Combimischer CM X | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Kontaminationsmonitor | LB 124 (β,γ Detektor) | Berthold (Bad Wildbad) |
| Kühlschrank | KB 4260 | Liebherr (Ochsenhausen) |
| Küvettenhalter, temperierbar | Cary single cell peltier accessory | Varian (Darmstadt)-jetzt agilent (Böblingen) |

| | | |
|--|--|---------------------------------------|
| Laufkammer für Agarose-Gele | Subcell® GT | Bio-Rad (München) |
| Laufkammer für SDS-Page | Mini-PROTEA® TetraSystem | Bio-Rad (München) |
| Leersäulen für Äkta | Tricorn™ Empty High Performance 10/20 Columns | GE Healthcare (Freiburg) |
| Magnetrührer | KMO 2 Basic | IKA® (Staufen) |
| Mehrfachdispenser | HandyStep® electronic | Brand (Wertheim) |
| Mikroplattenleser | Sunrise™ | TECAN® (Männedorf, Schweiz) |
| Mikroskop, invers | ID 03 | Zeiss (Oberkochen) |
| Mischblock, temperierbar | Mixing Block MB-102 | Biozym (Hessisch Oldendorf) |
| Netzteil für Laufkammern | PowerPac 300 | Bio-Rad (München) |
| Netzteil für Elektrophoretoren | EV 231 | Peqlab (Erlangen) |
| Nitrocellulosemembran | Amersham™ Hybond™ - ECL | GE Healthcare (Freiburg) |
| Objektive für Ti-Mikroskop | Plan Fluor 40x Oil, NA 1,4 Plan Apo VC 60xOil; NA 1,4 | Nikon Europa (Kingston, England) |
| pH-Meter | 766 Calimatic | Knick (Berlin) |
| Pipette | Research 10 | Eppendorf (Hamburg) |
| Pipetten | PIPETMAN® P (20,100,200,1000) | Gilson (Middleton, USA) |
| Pipettierhilfe | Pipetus® | Hirschmann (Eberstadt) |
| Präzisionswaage | PT 210 | Sartorius (Göttingen) |
| Reaktionsgefäße für DNA | DNA LoBind Tube® 1,5ml | Eppendorf (Hamburg) |
| Reaktionsgefäße für Protein | Protein LoBind Tube® 1,5ml | Eppendorf (Hamburg) |
| Reinraumwerkbank (Bakterien) | LaminAir® HB2472 | Thermo Scientific Heraeus® (Hanau) |
| Reinraumwerkbank (eukaryotische Zellen) | Hera Safe | Thermo Scientific Heraeus® (Hanau) |
| Reinstwasseranlage | Ultra Clear | SG (Barsbüttel) |
| Semi-Dry Elektrophoretoren | Sedec™ M | Peqlab (Erlangen) |
| Spritzensterilfilter | Filtropur S plus 0,2 | Sarstedt (Nümbrecht) |

| | | |
|--|---|--|
| Spektrofluorimeter | Cary Eclipse | Varian (Darmstadt) nun: agilent (Böblingen) |
| Spitzen für Mehrfachdispenser | PLASTIBRAND [®] PD-Tips | Brand (Wertheim) |
| Spritzen | Omnifix [®] | B. Braun (Melsungen) |
| Sterilisator | Function line | Thermo Scientific Heraeus [®] (Hanau) |
| Szintillationsgefäße | Scintillationsfläschchen mit Schraubverschluss | Sarstedt (Nümbrecht) |
| Szintillationszähler | multi-purpose scintillation counter LS 6500 | Beckman Coulter (Krefeld) |
| Taumelschüttler | WT 12 | Biometra (Göttingen) |
| Thermocycler | Primus 96 advance | Peqlab (Erlangen) |
| Thermomixer | Thermomixer compact | Eppendorf (Hamburg) |
| Ultraschall-Homogenisator | Sonoplus | Bandelin (Berlin) |
| UV/Vis Spektrophotometer | Cary Scan 50 | Varian (Darmstadt) nun: agilent (Böblingen) |
| UV/Vis Spektrophotometer | Nanophotometer | Implen (München) |
| Vortexer | MS 3 basic | IKA [®] (Staufen) |
| Wasserbad | Typ 1003 | GFL (Burgwedel) |
| Weithalsflasche für Hybridisierungssofen | Weithalsflasche | Biometra |
| Zellschüttler (Bakterien) | Innova [®] 4300 | New Brunswick Scientific-Eppendorf Vertrieb (Wesseling-Berzdorf) |
| Zellschüttler (Sf9-Zellen) | Excella [®] E24 und Innova [®] 44 | New Brunswick Scientific-Eppendorf Vertrieb (Wesseling-Berzdorf) |
| Zentrifugal-Filter 0,5 ml | Amicon Ultra- 0,5 ml 10K oder 30K, Ultracel [®] | Millipore (Billerica, USA) |
| Zentrifugal-Filter 15 ml | Amicon Ultra- 15 ml 10K oder 30K, Ultracel [®] | Millipore (Billerica, USA) |
| Zentrifuge | Heraeus [®] Multifuge [®] 1S-R Heraeus [®] Fresco [™] 21 | Thermo Scientific Heraeus [®] (Hanau) |
| Zentrifuge (Zellkultur) | Heraeus [®] Megafuge [®] 1.0 R | Thermo Scientific Heraeus [®] (Hanau) |

Alle oben nicht erwähnten Kunststoff-Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Greiner Bio-One (Frickenhausen) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Klonierung zur Herstellung neuer DNA-Konstrukte

Klonierungen im präparativen Ansatz wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dabei wurden die molekularbiologischen Methoden, beschrieben in Sambrook and Russell, 2001 zugrunde gelegt.

Für Insert-Vektor-Klonierungen, bei denen die entsprechenden DNA-Konstrukte in der Arbeitsgruppe vorhanden waren, wurden in einem Ansatzvolumen von 20 µl 6,5 µg Vektor-DNA mit jeweils 1 µl (entsprechend 2-10 definierte Einheiten (U)) der Restriktionsendonuklease versetzt. Von dem gewünschten zu klonierenden DNA-Fragment (Insert) wurden 12 µg DNA in 50 µl Ansatzvolumen, unter Zusatz von 1 µl Enzym, verwendet. Die Ansätze wurden für mindestens 3 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur verdaut. Der verwendete Puffer richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Die Durchführung eines Doppelverdaus mit zwei Enzymen erfolgte nach den Vorgaben der Fa. New England Biolabs auf der Internetseite Double Digest Finder (New England Biolabs).

Falls keine geeignete Ausgangs-DNA in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stand, wurden entsprechende sense- und antisense-Oligonukleotide von der Fa. Biomers bezogen und eine Zusammenlagerung (*Annealing*) nach deren Angaben durchgeführt. Die in Wasser resuspendierten Oligonukleotide wurden mit der gleichen Menge *Annealing*-Puffer versetzt und dann zwei Minuten auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz über einen Zeitraum von 45 min langsam bis auf eine Temperatur von 25 °C abgekühlt, bevor er weiter auf 4 °C gekühlt wurde. Dieses *Annealing*-Produkt wurde als Insert eingesetzt.

Des Weiteren konnten geeignete DNA-Inserts mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung spezifischer Primer erhalten werden. Hierfür wurde das TOPO[®]-TA-Cloning Kit der Fa. Invitrogen verwendet. Die PCR erfolgte mit der *Taq*-Polymerase nach Herstellerangaben in dem geeigneten Puffer und den entsprechenden PCR-Bedingungen und Zyklenanzahl. Der Vorteil der *Taq*-Polymerase ist, dass sie einen 3'-A(Adenin) Überhang produziert, wodurch das PCR-Produkt direkt in den pCR[®] 2.1. TOPO[®] Vektor kloniert werden kann, welcher einen 3'-T (Thymin) Überhang aufweist.

Zur Vermeidung einer spontanen Religierung des aufgeschnittenen Vektors wurden dessen 5'-Phosphatreste durch Zugabe von 3 µl Shrimp Alkaline Phosphatase bei 37 °C

für 30 min entfernt. Anschließend wurde die Phosphatase für 15 min bei 65 °C inaktiviert.

Die anschließende Auftrennung der Fragmente erfolgte, wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben, über ein Agarosegel. Nach der Detektion wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel isoliert und die Gelfragmente bei -80 °C für 15 min eingefroren, was zur Zerstörung der Gelmatrix führte. Die Isolierung der DNA erfolgte anschließend durch langsames Erwärmen der gefrorenen Gelfragmente durch Körperwärme. Die DNA-haltige Flüssigkeit konnte aufgefangen werden, während die Agarose gallertartig zurückblieb. (Thuring et al., 1975).

Aus diesen Ansätzen konnte direkt eine Ligation von Insert und Vektor pipettiert werden. Durch die eingesetzte T4 DNA-Ligase wurden neue Phosphodiesterbrücken zwischen Vektor und Insert gebildet, woraus eine ringförmige Plasmid-DNA resultierte. Die Durchführung erfolgte in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 2 h bei Raumtemperatur, wobei verschiedene Insert-Vektor-Verhältnisse gewählt wurden. Das Gesamtansatzvolumen betrug 20 µl, wovon 10 µl anschließend für eine Transformation in kompetente Zellen eingesetzt wurden (s. Kapitel 3.2.4). Aus diesen konnte dann die gewünschte Plasmid-DNA isoliert werden (s. Kapitel 3.2.5).

3.2.1.1 Klonierung der HOs und der hBVR

Sowohl die humanen Hämoxygenasen (HO) -1 und -2 als auch die humane Biliverdin-IX α -Reduktase (hBVR) wurden von einem ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, Dr. Georg Berndt im Vorfeld meiner Arbeit, kloniert. Dazu wurde ausgehend von FirstChoice[®] PCR ready human placenta cDNA (Fa. Ambion, Austin, USA) mit Hilfe der PCR unter Verwendung spezifischer Primer (HO1: P256/P257; HO2: P258/259; hBVR: P285/286) die gewünschte DNA amplifiziert und anschließend in den pCR[®] 2.1-TOPO[®]-Vektor nach der TOPO[®]-TA-Cloning Anleitung der Fa. Invitrogen kloniert. Ausgehend von diesen Konstrukten wurde die HO-1 mit *EcoRI/XbaI* (974 bp Fragment) und die HO-2 mit *EcoRI/KpnI* (1062 bp Fragment) entsprechend mit den gleichen Enzymen in pFastBac[™]-1 (pFB) kloniert. Die entstandenen Konstrukte wurden als pFB-HO-1 und pFB-HO-2 bezeichnet. Die hBVR zur Herstellung von pFB-hBVR wurde in zwei aufeinanderfolgenden Schritten in pFastBac[™]-1 kloniert. Hierzu wurde mit *EcoRI/NotI* (337 bp Fragment) und *NotI/KpnI* (643 bp Fragment) geschnitten und die beiden Fragmente *EcoRI/KpnI* in pFastBac[™]-1 eingebracht (s. auch Haase et al., 2010b).

3.2.1.2 *Strep-tag*[®] II-Klonierung an die HO-1-Konstrukte

Ausgehend von der HO-1 im pCR 2.1. Vektor (s. Kapitel 3.2.1.1) wurde mit Hilfe des TOPO[®]-TA-Cloning Kits unter Verwendung der Primer P333 und P256 eine PCR durchgeführt, um den *Strep-tag*[®] II (S) amino-terminal einzuführen (s. Kapitel 3.2.1). Der sense Primer enthielt sowohl die Information für den *Strep-tag*[®] II als auch eine

NotI- Schnittstelle. Das PCR Produkt wurde anschließend mit dem pCR[®] 2.1. TOPO[®] Vektor ligiert und eine Transformation in kompetente *E.coli*-Zellen durchgeführt. Nach Isolierung der Plasmid-DNA (s. Kapitel 3.2.5) wurde diese mit *NotI* und *XbaI* geschnitten und das isolierte Fragment (974 bp) in den pFastBac[™]-1 Vektor kloniert, welcher mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt wurde. Das entstehende Konstrukt wurde als pFB-S-HO-1 bezeichnet. Die inaktiven Mutanten wurden mit Hilfe einer Mutagenese unter Verwendung von pFB-S-HO-1 als Ausgangs-DNA (s. Kapitel 3.2.2.1) erzeugt.

3.2.1.3 *Strep-tag*[®]II-Klonierung an die HO-2-Konstrukte

Zur Einführung des *Strep-tags*[®]II (S) an das amino-terminale Ende der HO-2 wurden die Oligonukleotide P321 und P322 verwendet. Diese trugen zum einen die Information für den *Strep-tag*[®]II und zum anderen entsprach das 5'Ende (bezogen auf den sense-Strang) dem Überhang einer *PauI* Schnittstelle und das 3'Ende einer *ApaI* Schnittstelle. Nach der Zusammenlagerung (vgl. Kapitel 3.2.1) wurde das *Annealing*-Produkt mit der Ausgangs-DNA pFB-HO-2 ligiert, welche zuvor mit *BssHII* (Isoschizomer zu *PauI*) und *ApaI* aufgeschnitten wurde. Das entstandene Plasmid wurde als pFB-S-HO-2 bezeichnet. Die Mutationen wurden im Anschluss eingeführt unter der Verwendung von pFB-S-HO-2 als Ausgangs-DNA (s. Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.2.4).

3.2.1.4 Fluoreszenzprotein-Klonierung an die HO-1-Konstrukte

Zur Einführung der Fluoreszenzproteine grün-fluoreszierendes Protein (GFP), cyan-fluoreszierendes Protein (CFP) und gelb-fluoreszierendes Protein (YFP) an den Amino-Terminus der HO-1, wurde als Ausgangskonstrukt pFB-HO-1 verwendet. Die HO-1 wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *KpnI* isoliert (996 bp) und in den pEGFP-C1 Vektor (Fa. Clontech, Heidelberg) kloniert, welcher mit den gleichen Enzymen behandelt wurde. Aus dem entstandenen Konstrukt pEGFP-HO-1 wurde anschließend wieder die HO-1 mit den oben genannten Enzymen isoliert, um sie dann in die *EcoRI/KpnI* aufgeschnittenen Vektoren pECFP-C1 und pEYFP-C1 (beide Fa. Clontech) zu klonieren. Die drei entstandenen Plasmid-DNAs (pEXFP-HO-1¹) wurden anschließend einer Mutagenese unterzogen (s. Kapitel 3.2.2.3), um ein Triplet einzuführen, welches für ein Stopcodon codiert (pEXFP-HO-1ΔC266). Für die Untersuchungen im Sf9-System wurden die CFP und YFP markierten HO-1 und HO-1ΔC266 Konstrukte (1764 bp) mit den Enzymen *NheI/KpnI* aus den oben beschriebenen Plasmiden isoliert und in den pFastBac[™]-1 -Vektor mit den Enzymen *SpeI/KpnI* umklontiert. *NheI* und *SpeI* bildeten hierfür kompatible Enden aus. Die entstandenen Konstrukte wurden als pFB-CFP-HO-1, pFB-YFP-HO-1, pFB-CFP-HO-1ΔC266 und pFB-YFP-HO-1ΔC266 bezeichnet.

¹ das X steht für G,C oder Y der jeweiligen Fluoreszenzproteine GFP,CFP und YFP

3.2.1.5 Fluoreszenzprotein-Klonierung an die HO-2-Konstrukte

Für die Fusionierung des GFPs an das amino-terminale Ende der HO-2 wurde die HO-2 aus pFB-HO-2 mit den Restriktionsenzymen *BspEI* und *HindIII* isoliert (983 bp) und in den pEGFP-C1 Vektor kloniert, welcher mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde. Das entstandene Plasmid wurde als pEGFP-HO-2 bezeichnet. Die HO-2 CPF-Mutante pEGFP-HO2 C265S/C282S wurde analog kloniert. Als Ausgangskonstrukt diente pFB-HO2 C265S/C282S (s. Kapitel 3.2.2.5). Für die trunkierte Form der HO-2 (HO-2 Δ C289) wurde an die entsprechende Stelle der Aminosäuren-Position 289 mit Hilfe einer Mutagenese ein Stopcodon in das Konstrukt pEGFP-HO-2 eingeführt (s. Kapitel 3.2.2.4). Das entstandene Konstrukt wurde als pEGFP-HO-2 Δ C289 bezeichnet. Für die Klonierungen in die Vektoren pECFP-C1 und pEYFP-C1 wurden die Fragmente HO-2 und HO-2 Δ C289 aus dem pEGFP-C1 Konstrukt, mit Hilfe der Enzyme *BspEI* und *HindIII*, umklont. Es entstanden pECFP-HO-2, pEYFP-HO-2, pECFP-HO-2 Δ C289 und pEYFP-HO-2 Δ C289. Die Umklonierung der CFP und YFP markierten HO-2-Konstrukte in den pFB-Vektor erfolgte mit den Enzymen *NheI/HindIII*. Es entstanden 1722 bp große Fragmente, welche mit dem, mit *SpeI/HindIII* aufgeschnitten pFastBacTM-1 -Vektor ligiert wurden zu pFB-CFP-HO-2, pFB-YFP-HO-2, pFB-CFP-HO2 Δ C289 und pFB-YFP-HO-2 Δ C289.

3.2.1.6 Fluoreszenzprotein-Klonierung an die CPR

Die für die Klonierungen verwendete Ausgangs-DNA Humane CYPOR cDNA (CPR) in pUV I war ein Geschenk von Dr. F. Gonzalez (National Cancer Institute, National Institutes of Health, Rockville, USA). Für die carboxy-terminale Fusion mit dem Fluoreszenzprotein YFP war es nötig, das für ein Stopcodon codierende Basentriplett der CPR durch Austausch einzelner Nukleotide zu entfernen. Dies wurde mit Hilfe einer Mutagenese (s. Kapitel 3.2.2) unter Verwendung der Primer P353 und 354 erreicht, wobei auch gleichzeitig eine *HindIII* Schnittstelle eingeführt wurde. Die CPR wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *HindIII* in den pEYFP-N-Vektor kloniert, welcher mit *BglII/HindIII* geschnitten wurde. *BglII* und *BamHI* bildeten hierbei kompatible Enden aus. Da bei dieser Klonierung der Leserahmen zwischen der CPR und dem YFP verschoben und somit das YFP nicht richtig abgelesen worden wäre, musste zuvor der Vektor modifiziert werden. Hierzu wurde der Ausgangsvektor pEYFP-N1 (Fa. Clontech) mit *EcoRI* aufgeschnitten und die 5'-Überhänge mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase unter Verwendung des geeigneten Puffers und eines dNTP-Mixes aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 72 °C für 30 min, bevor eine Ligation und eine anschließende Transformation durchgeführt wurden. Durch das Auffüllen wurden insgesamt vier Basenpaare eingeführt und somit der Leserahmen um ein Triplett und ein zusätzliches Basenpaar verschoben. Das Konstrukt wurde als pEYFP-N-CPR bezeichnet. Zum Austausch des YFPs durch CFP wurde das CFP-Fragment (735bp) aus pECFP-N1 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *AgeI/NotI* isoliert und in pEYFP-N-CPR kloniert, welches mit den gleichen Enzymen geschnitten wurde. Die entstandenen

Fusionskonstrukte konnten anschließend mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *NotI* geschnitten und die 2888 bp großen Fragmente in pFastBacTM-1 kloniert werden, welcher mit *SpeI/NotI* geschnitten wurde. *NheI* und *SpeI* bilden hierfür kompatible Enden. Es entstand pFB-CPR-CFP und pFB-CPR-YFP.

3.2.1.7 Fluoreszenzprotein-Klonierung an die hBVR

Die hBVR wurde amino-terminal mit CFP fusioniert (pECFP-hBVR). Hierzu wurde die hBVR als 888 bp großes Fragment aus dem pFastBacTM-1 Vektor mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *SpeI* isoliert. Das erhaltene Fragment wurde dann in den pECFP-C2 Vektor mit *BamHI* und *XbaI* kloniert. Da hierbei der Leserahmen allerdings verschoben gewesen wäre, wurde der pECFP-C2 Vektor zuvor mit *XhoI* und *SalI* aufgeschnitten und wieder religiert, wodurch 26 bp entfernt wurden. Um die *XbaI* Schnittstelle in dem Vektor für die hBVR-Einführung nutzen zu können, wurde der neu erhaltene Vektor in dam-/dcm- kompetente *E.coli* transformiert, die DNA isoliert und für die weiteren Schritte eingesetzt.

3.2.1.8 Klonierungen der NOsGC-Untereinheiten

Die Konstrukte und Viren für die humanen α_1 und β_1 - Untereinheiten in pFastBacTM-1 waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden (Giuli et al., 1992, Koglin and Behrends, 2000, Koglin et al., 2001). Die zur Anreinigung benötigte *Strep*-tag[®] II-Variante der β_1 -Untereinheit war ebenfalls in der Arbeitsgruppe vorhanden. Hierbei wurde der *Strep*-tag[®] II an das carboxy-terminale Ende der Ratten-Untereinheiten kloniert und als β_1 -S in pFB bezeichnet (Budäus, 2002, Haase et al., 2010a). α_1 -Grx1-roGFP2 wurde kloniert wie in Kraehling et al., 2011 beschrieben. Grx1-roGFP2 in pLPCX wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Tobias Dick (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Gutscher et al., 2008).

3.2.2 Mutagenese von Plasmid-DNA

Um eine Mutation in eine Plasmid-DNA einzuführen, wurden spezifische Primer eingesetzt, die die Information für den Austausch einzelner Nukleotide enthielten. Um hierfür optimale Primerbedingungen zu erreichen, wurden diese mit Hilfe des QuickChange[®] Primer Design tool der Fa. Agilent Technologies (ehemals Stratagene) entworfen und durch die Fa. Biomers synthetisiert. Für die Durchführung der Mutagenesen wurde, wenn nicht anders erwähnt, das QuickChange[®] Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit der Fa. Agilent Technologies (ehemals Stratagene) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Von der Ausgangs-DNA wurden 100 ng und von den Primern jeweils 125 ng eingesetzt. Die PCR erfolgte ebenfalls genau nach Herstellerangaben. Die neu entstandene Plasmid-DNA lag im Gegensatz zum Ausgangsplasmid unmethyliert vor, weshalb die Ausgangs-DNA gezielt mit Hilfe einer methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease (*DpnI*) verdaut werden konnte.

Anschließend erfolgte eine Transformation der DNA in XL10Gold® ultrakompetente Zellen (s. Kapitel 3.2.4.). Für die verwendeten Primer wurden jeweils nur die Arbeitsgruppen-internen Abkürzungen verwendet (s. Kapitel 3.1.7). Die Angaben der Mutationen beziehen sich auf die Aminosäuren im abgelesenen Protein.

3.2.2.1 Herstellung einer inaktiven HO-1 Mutante

In der Literatur ist beschrieben und durch Kristallstrukturen belegt, dass das Histidin an Position 25 der humanen HO-1 essentiell für die Bindung des Substrates Häm und damit für die katalytische Aktivität ist (Ishikawa et al., 1992; Ito-Maki et al., 1995, Lad et al., 2003). Aus diesem Grund wurde an diese Position mit Hilfe der Primer P349 und P350 ein Alanin kloniert, um eine inaktive Mutante zu erhalten, welche als pFB-HO-1H25A bezeichnet wurde. Als Ausgangskonstrukt diente pFB-HO-1 (s. Kapitel 3.2.1.1).

3.2.2.2 Herstellung einer inaktiven HO-2 Mutante

Das analoge Histidin zu H25 der humanen HO-1 ist bei der humanen HO-2 das Histidin an Position 45 (vgl. Abbildung 1.1), welches ebenfalls an der Hämbindung beteiligt ist (Ishikawa et al., 1998, Bianchetti et al., 2007). Dieses wurde in pFB-HO-2 ebenfalls zu einem Alanin mutiert unter Verwendung der Primer P351 und P352. Die entstehende Mutante wurde als pFB-HO-2H45A bezeichnet.

3.2.2.3 Herstellung einer carboxy-terminal verkürzten HO-1 Mutante

Für die Untersuchungen der Rolle des Carboxy-Terminus bei der CPR-Interaktion wurde eine carboxy-terminal verkürzte Variante hergestellt. Das Triplet, das für ein Prolin an Position 266 codiert, wurde durch Verwendung der Primer P367 und P368 zu dem Stopcodon TAG mutiert. Daraus resultierte eine HO-1 Mutante bestehend aus 265 Aminosäuren. Diese wurde als HO-1ΔC266 bezeichnet. Als Ausgangskonstrukte dienten pFB-S-HO-1 und pEXFP-HO-1².

3.2.2.4 Herstellung einer carboxy-terminal verkürzten HO-2 Mutante

Analog der carboxy-terminalen Mutante der HO-1 wurde für die HO-2 eine verkürzte Mutante (HO-2ΔC289) bestehend aus 288 Aminosäuren kloniert. Dazu wurde das für Alanin codierende Triplet an Position 289 mit Hilfe der Primer P347 und P348 durch das Stopcodon TGA ersetzt. Die Ausgangs-DNAs waren pFB-S-HO-2 und pEGFP-HO-2.

3.2.2.5 Mutation der CPF-Motive der HO-2

Für die Untersuchung der Rolle der CPF-Motive der HO-2 wurden die Cysteine an den Positionen 265 und 282 zu Serinen mutiert, unter Verwendung der Primerpaare

² das X steht für G,C oder Y der jeweiligen Fluoreszenzproteine GFP, CFP und YFP

P300/P301 und P302/P303. Für die Untersuchungen wurde die *Strep*-tag[®] II markierte Variante der HO-2 eingesetzt. Zuerst wurde die C265S Mutation in pFB-S-HO-2 eingeführt unter der Verwendung der Primer P300/P301. Anschließend wurde das entstandene Plasmid pFB-S-HO-2C265S mit Hilfe der Primer P302 und P303 mutiert. Das Konstrukt wurde als pFB-S-HO-2C265S/C282S bezeichnet.

3.2.2.6 Mutation des CPF-Motivs der α_1 -Untereinheit der NOsGC

Das Cystein an Position 15 der α_1 -Untereinheit der NOsGC ist Bestandteil eines CPF-Motivs und sollte analog der HO-2 CPF Mutanten zu einem Serin mutiert werden. Hierfür diente die humane α_1 -Untereinheit in pFastBac (s. Kapitel 3.2.1.8) als Ausgangskonstrukt und wurde unter Verwendung der Primer 299 und 304 mutiert. Zur Bestimmung des Redox-Potentials der α_1 -CPF-Mutante im Vergleich zum Wildtyp wurde die C15S Mutation in α_1 -Grx1-roGFP2 mit Hilfe der Primer P313 und P314 eingeführt, welche spezifisch für die Sequenz der Spezies *Rattus norvegicus* waren. Verwendet wurde hierfür das Phusion[™] High Fidelity PCR Kit nach Herstellerangaben.

3.2.3 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Top10 Zellen

E.coli-Bakterien können durch die Behandlung mit CaCl₂ chemisch kompetent gemacht werden (Sambrook and Russell, 2001). Kompetent bezeichnet hierbei die Fähigkeit der Zellen Plasmid-DNA aufzunehmen. Für die Herstellung wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur beimpft. Die Bakteriensuspension wurde bei 37 °C so lange geschüttelt bis eine OD_{595 nm} von 0,6 erreicht war. Anschließend wurde die Suspension für 15 min auf Eis abgekühlt, bevor sie 5 min lang bei 4500 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Die Resuspendierung des Zellpellets erfolgte mit 25 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4500 rpm und 4 °C wurde das Zellpellet mit 10 ml einer eiskalten Mischung aus 0,1 M CaCl₂-Lösung und 20 % (v/v) Glycerin Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Kompetenztestung erfolgte mit dem Kontrollplasmid pUC 19.

3.2.4 Transformation und Transposition von kompetenten *E.coli*-Zellen

Die Aufnahme von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Dafür wurden 100 µl kompetente *E.coli*-Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sek durchgeführt, wodurch die Bakterienwand durchlässig und die DNA aufgenommen wurde. Eine weitere Inkubation auf Eis für zwei min führte zur Wiederverschließung der Poren. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die

Bakteriensuspensionen für eine Stunde bei 37 °C und 500 rpm geschüttelt, bevor sie auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert wurden. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Antibiotikaresistenz ist abhängig von dem verwendeten Plasmid-Vektor. Es können sich nur solche *E.coli*-Zellen vermehren, die die Plasmid-DNA aufgenommen haben. Diese können die für die Antibiotikaresistenz benötigten Proteine exprimieren und besitzen dadurch einen Selektionsvorteil. Für die Transformation nach einer Ligation wurden 90 µl kompetente *E.coli*-Zellen und 10 µl Ligationsansatz verwendet. Der Transposition ging eine Transformation von Max Efficiency® DH10Bac™ Zellen voraus. Die Durchführung erfolgte analog der Transformation mit dem Unterschied der verlängerten Inkubation bei 37 °C für 3 h. Die anschließende Ausplattierung erfolgte auf Transpositions-Platten, welche für 72 h bei 37 °C inkubiert wurden (weitere Erklärungen siehe Kapitel 3.3.1).

3.2.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen

Die heute meist verwendete Methode zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Übernightkulturen ist die alkalische Lyse nach Birnboim and Doly, 1979. Diese Methode kann sowohl im kleinen Maßstab (Minipräparation) als auch zur Isolierung größerer DNA Mengen verwendet werden. Für die Minipräparation wurden mehrere Ansätze einer *E.coli*-Übernightkultur benötigt. Ein Ansatz enthielt 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium und eine nach der Transformation erhaltene, von der Agarplatte gepickte Bakterienkolonie. Von diesen Overnightkulturen wurden 2 ml zentrifugiert und das Bakteriensediment in 100 µl einer fast neutralen Minipräparation-Lösung I resuspendiert und 10 min inkubiert. Die Lösung wurde zuvor mit RNase (1 µg/ml) und Lysozym (100 µg/ml) versetzt. Nach Zugabe von 200 µl der sehr alkalischen Lösung II wurde erneut für 10 min inkubiert, wobei die Bakterien lysierten und sowohl die Proteine als auch die DNA denaturierte. Die 10-minütige Inkubation mit Lösung III bewirkte eine Neutralisation, wobei die kleine Plasmid-DNA sich wieder zusammenlagern konnte, während die viel größere chromosomale DNA zusammen mit den Proteinen und dem entstandenen Kalium-SDS ausfiel. Diese Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 21.000 x g für 15 min abgetrennt. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 450 µl Isopropanol und 45 µl Natriumacetat pH 4,5 gefällt und anschließend bei 21.000 x g für 30 min abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit Ethanol 70 % gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl Reinstwasser resuspendiert. Zur Zerstörung der DNasen wurde der Ansatz bei 65 °C für 10 min inkubiert, bevor er für weiterführende Versuche eingesetzt werden konnte.

Für die Präparation größerer DNA-Mengen (Maxipräparation) wurden 200 ml einer angesetzten Overnightkultur verwendet. Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des HiPure Plasmid Maxi Prep® Reagenziensystems der Fa. Invitrogen. Der Vorteil hierbei war die zusätzliche Anreinigung über eine Affinitätssäule. Das DNA-Pellet wurde in

250 µl Reinstwasser aufgenommen. Die DNasen wurden analog der Minipräparation zerstört.

3.2.6 Analyse von Plasmid-DNA

Die Konzentrations- und die Reinheitsbestimmung sollten allen weiterführenden Untersuchungen der gewonnenen Plasmid-DNA vorausgehen, um definierte Mengen einsetzen zu können. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch am Nanophotometer der Fa. Implen bei einer Extinktionswellenlänge von 260 nm bestimmt. Das Nanophotometer berechnete automatisch die DNA-Konzentration aus der optischen Dichte (OD), einem für dsDNA spezifischen Multiplikationsfaktor und dem Verdünnungsfaktor. Des Weiteren gab das Nanophotometer auch die Reinheit der DNA an, welche sich aus dem Verhältnis OD 260 zu OD 280 ergab. Die Extinktionswellenlänge 280 nm ist spezifisch für Proteine. Eine optimale Reinheit der DNA liegt bei einem Quotienten von 1,8, der aber stark vom pH-Wert und dem Salzgehalt des verwendeten Wassers abhängt (Wilfinger et al., 1997). Die Berechnung der Reinheit beruht auf der Methode von Warburg und Christian, die ursprünglich für die Proteinbestimmung entwickelt wurde, heute aber genauso Anwendung in der DNA-Bestimmung findet (Warburg and Christian, 1941).

Die Überprüfung der präparierten DNA erfolgte mit Hilfe von verschiedenen Restriktionsendonukleasen. Diese wurden so gewählt, dass sich nach Auftrennung im Agarosegel ein spezifisches Bandenmuster ergab (s. Kapitel 3.2.7). Dieses gab Aufschluss über die Größe und auch über die Orientierung der klonierten DNA. Zur abschließenden Untersuchung wurde eine kleine DNA-Menge zur Fa. GATC nach Konstanz geschickt, die sich auf DNA Sequenzierung spezialisiert hat. Die erhaltene Basensequenz wurde mit theoretischen Vektorkarten verglichen.

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von DNA-Fragmenten genutzt. Im elektrischen Feld wandert die negativ geladene DNA zur Anode, kleinere Fragmente wandern hierbei schneller als größere. Durch den DNA-Interkalator Ethidiumbromid kann die DNA durch UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht werden. Für die Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose mit TAE-Puffer aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen wurde das Ethidiumbromid zugegesetzt (s. Kapitel 3.1.5). Die Lösung wurde in Gelkammern gegossen, wo sie gelierte. Die zu untersuchenden DNA-Ansätze wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit dem DNA-Marker als Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 100V mit TAE als Laufpuffer. Die anschließende UV-Detektion wurde mit dem Geldokumentationssystem Gel iX Imager durchgeführt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden und Zellkultur

3.3.1 Rekombinante Proteinexpression durch Baculoviren

Die zur rekombinanten Expression verwendeten Sf9-Zellen sind eukaryotische Zellen, gewonnen aus den Ovarzellen der Insektenzelllinie *Spodoptera frugiperda* (Familie Noctuidae, Ordnung Lepidoptera). Sie wurden durch Modifikation der Zelllinie IPLB-SF21 AE hergestellt (Vaughn et al., 1977). Die Verwendung von eukaryotischen Zellen bietet im Gegensatz zu *E.coli*-Zellen den Vorteil, dass größere Proteine exprimiert werden können und z.B. das Methylierungs- oder das Glykosylierungsmuster denen der Säugerproteine ähnlich sind. Zur Infektion der Sf9-Zellen werden Baculoviren, meistens das AcMNPV (*Autographa californica Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus*) oder Varianten davon, verwendet (Smith et al., 1983). Diese sind doppelsträngige, zirkuläre DNA-Viren der Familie der Baculoviridae. Ein Vorteil der Verwendung von Baculoviren liegt in der sehr schnellen und hohen Proteinausbeute. Da die Virenpromotoren in Säugerzellen nicht aktiv sind, ist die Gefahr für den Menschen sehr gering (Carbonell et al., 1985). Das Virusgenom ist mit knapp 130 kb sehr groß, weshalb für die Integration der gewünschten cDNA ein spezieller Transfervektor verwendet werden muss. Die Fa. Invitrogen bietet hierfür das spezielle Bac-to-Bac[®] Expressionssystem an, welches in einem kurzen Schema in Abbildung 3.2 dargestellt ist. Als Transfervektor wurde der pFastBac[™]-1 Vektor verwendet, in den das gewünschte Gen kloniert wurde. Dieser enthält einen Polyhedrin Promotor, der später für hohe Proteinausbeuten sorgt (Kitts and Possee, 1993). Nach der Transformation in Max Efficiency[®] DH10Bac[™] kompetente Zellen konnte eine Transposition in Bacmid DNA stattfinden. Dies geschah in der speziellen Region mini-*att7* in Anwesenheit des Helferplasmids (Luckow et al., 1993). Durch erfolgreiche Transposition wurde das *lacZα* Gen auf der Bacmid DNA zerstört, welches für die β -Galactosidase codiert. Dies konnte nach Ausplattieren auf Transpositionsplatten für eine Blau-Weiß Selektion genutzt werden. Die Transpositionsplatten enthielten hierfür den Farbstoff Bluo-Gal und IPTG als Induktor. Weiterhin enthielten die Platten die Antibiotika Kanamycin, Gentamycin und Tetracyclin, welche für die Bakterienselektion genutzt werden. Aus den weißen, positiven Klonen konnte die Bacmid-DNA durch Präparation hochmolekularer DNA gewonnen (vgl. Protokoll einer Minipräparation, s. Kapitel 3.2.5) und anschließend durch PCR auf Richtigkeit überprüft werden (vgl. Abbildung 3.1).

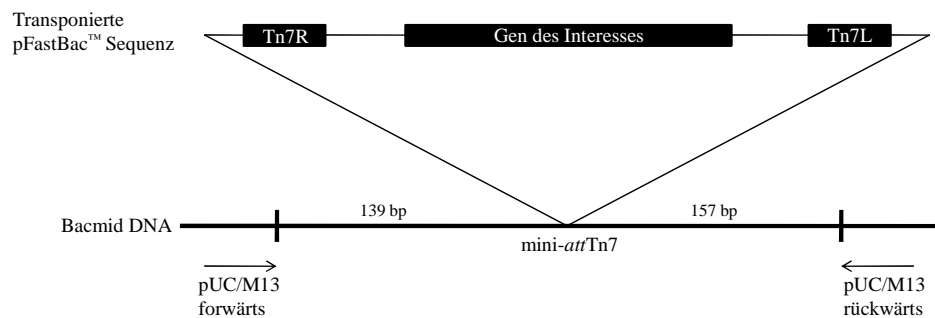


Abbildung 3.1: Bacmid-Überprüfung mittels PCR. Durch die eingesetzten Primer werden nur die eingezeichneten Regionen amplifiziert. Hat die Transposition stattgefunden, kann nach Auftrennung über ein Agarosegel eine Bande bei 2300 bp + der Größe des Gens des Interesses detektiert werden. Bei den negativen Klonen entsteht eine Bande bei 300 bp.

Die Bacmid-DNA wurde zur Transfektion von Sf9-Zellen genutzt, die dann den rekombinanten Baculovirus produzieren konnten (Kapitel 3.3.1.2). Dieser konnte dann entweder amplifiziert oder zur Proteinexpression verwendet werden. Bevor die Sf9-Zellen infiziert wurden, wurde in der Regel der Virustiter bestimmt, wodurch die Menge an benötigtem Virus bestimmt werden konnte (Kapitel 3.3.1.3).

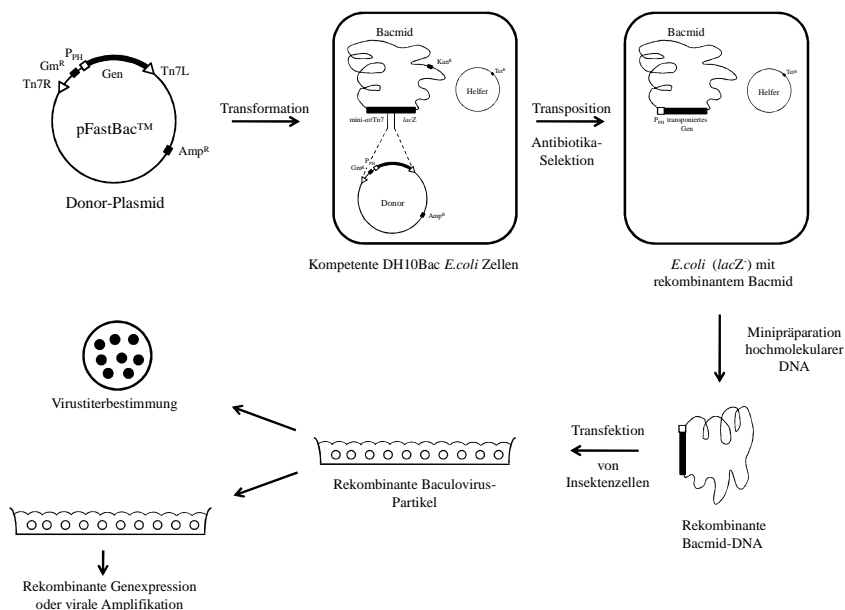


Abbildung 3.2: Das Bac-to-Bac® Expressionssystem (schematische Darstellung nach Invitrogen)

3.3.1.1 Kultivierung von Sf9-Zellen

Sf9-Zellen wurden bei 27 °C ohne CO₂ Begasung kultiviert. Für Transfektionszwecke wurden die Zellen als Monolayer, ansonsten als Suspensionskultur bei 140 rpm gehalten. Zur Kultivierung wurde das Sf-900II SFM Medium der Fa. Gibco verwendet. Vor Gebrauch wurde dieses mit einer FBS-Lösung (10 %) und einer Mischung aus Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) (1 %) versetzt. Die Zellen wurden alle drei Tage 1:4 gesplittet. Die Monolayer-Kulturen wurden hierfür zuvor mit einem

Zellschaber abgelöst und mit einer Pipette vorsichtig resuspendiert. Die maximale Kultivierungskonzentration von ungefähr 5×10^6 Zellen/ml sollte nicht überschritten werden. Die Verdopplungszeit der Sf9-Zellen betrug unter optimalen Bedingungen 18-24 h.

3.3.1.2 Transfektion und Amplifikation zur Baculoviren-Produktion

Die Transfektion von Sf9-Zellen zur Baculovirusproduktion wurden entsprechend der Anleitung der Fa. Invitrogen durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde serum- und antibiotikafreies Sf 900II SFM Medium verwendet. Pro Vertiefung einer sechs-*well*-Platte wurden $0,8 \times 10^6$ Sf9-Zellen in einem Volumen von 2 ml ausgesät und 30 min anwachsen gelassen. 1 µg Bacmid DNA wurde in 100 µl Medium verdünnt. Als Transfektionsreagenz wurde Cellfectin II verwendet. 8 µl Cellfectin II wurden ebenfalls mit 100 µl Medium verdünnt und anschließend mit der verdünnten Bacmid-DNA zusammengeführt. Die Mischung wurde für 30 min inkubiert, bevor sie tropfenweise auf die ausgesäten Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden für 3-5 h bei 27 °C inkubiert. Danach fand ein Mediumwechsel auf Sf 900 II SFM Medium mit FBS (10 % (v/v)) und Pen/Strep (1 % (v/v)) statt. Nach 5-tägiger Inkubation wurden die Zellen abgeschabt und zusammen mit dem Überstand für die Virusamplifikation eingesetzt. Hierfür wurden 100 ml Sf9-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml mit serum- und antibiotikahaltigem Sf 900 II SFM-Medium verwendet. Die Ansätze wurden fünf Tage bei 27 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Letalität mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau bestimmt, der sich nur in toten Zellen anreichern kann. Bei einer Letalität von 60 % wurde die Zellsuspension bei 4000 rpm für 10 min, 4 °C abzentrifugiert und der Überstand mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert.

Der Baculovirus, der die Information für die CPR trägt, wurde freundlicherweise von Dr. D. Schwarz, Berlin, zur Verfügung gestellt. Alle anderen verwendeten Baculoviren wurden entweder in der Arbeitsgruppe durch andere Mitarbeiter oder durch mich hergestellt.

3.3.1.3 Bestimmung des Baculovirustiters

Die Titerbestimmung der Baculoviren ist nötig, um die Kompetenz der Viren zu bestimmen. Hieraus kann wiederum die Menge an Virus berechnet werden, die für die Infektion von Sf9-Zellen zur Proteinexpression benötigt wird (s. Kapitel 3.3.1.4). Bei der verwendeten Endpunktsverdünnungsmethode wird die Virusverdünnung bestimmt, die 50 % der Kultur infiziert (Reed and Muench, 1938). Von Sf9-Zellen wurden je 100 µl in einer Konzentration (5×10^4 Zellen/ml) in die Vertiefungen einer 96-*well* Mikrotiterplatte ausgesät und mit 10 µl der zu untersuchenden Virussuspension infiziert. Diese wurde aufsteigend in einem Konzentrationsbereich von 10^{-2} bis 10^{-9} eingesetzt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Sf9-Zellen. Nach 5-7 Tagen Inkubation bei 27 °C wurde die Mikrotiterplatte unter dem Mikroskop betrachtet und pro

Verdünnung das Verhältnis (in %) der Vertiefungen, in denen die Zellen infiziert waren, zu den Vertiefungen ohne erkennbare Infektion, bestimmt. Eine Infektion konnte daran erkannt werden, dass die Zellen einen vergrößerten Zellkern aufwiesen und nicht mehr fest am Plattenboden angewachsen waren. Aus diesem Verhältnis konnte mit folgender Formel die Virusverdünnung berechnet werden, bei der 50 % der Zellen infiziert werden ($TCID_{50}$):

$$TCID_{50} = 10^{(V(A_{exp}) - PD)} \quad 3.1$$

mit

$$PD = \frac{(A_{\%} - 50)}{(A_{\%} - B_{\%})} \quad 3.2$$

$A_{\%}$ = Prozentsatz der Vertiefungen mit infizierten Zellen, bei der Virusverdünnung (A), bei der die Infektiösität größer 50 % war

$B_{\%}$ = Prozentsatz der Vertiefungen mit infizierten Zellen bei der Virusverdünnung (B), bei der die Infektiösität kleiner 50 % war

PD = proportionale Distanz des 50 %-Signals zum Signal der Virusverdünnung A

$V(A_{exp})$ = der Exponent der Virusverdünnung A

Weiterführende Literatur zur Methode und der Berechnung finden sich bei Dougherty, 1964 und Hughes and Wood, 1986. Mit Hilfe der bestimmten Virusverdünnung konnte anschließend der spezifische Titer der untersuchten Virussuspension berechnet werden. Ein üblicher Titer liegt zwischen 10^{-8} und 10^{-9} pfu/ml.

$$Virustiter \left(\frac{pfu}{ml} \right) = \left(\frac{1}{TCID_{50}} \right) \times 0,69 \times Faktor \quad 3.3$$

pfu = plaque forming unit

$Faktor$ = Quotient aus 1 ml und dem eingesetzten Volumen der Virussuspension (hier 10 μ l \rightarrow Faktor 100)

3.3.1.4 Infektion von Sf9-Zellen zur Proteinexpression

Für die Infektion von Sf9-Zellen sollte ein ideales Verhältnis von Viren zu Zellen gewählt werden, das auch als MOI (*multiplicity of infection*) bezeichnet wird und die Einheit pfu/Zelle trägt (s. Kapitel 3.3.1.3). Sf9-Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml verwendet und mit einer Virusmenge entsprechend einem MOI-Wert von 0,5-4 infiziert. Das dafür benötigte Volumen an Virussuspension konnte mit folgender Formel berechnet werden (s. dazu auch Kapitel 3.3.1.3).

$$\text{Volumen (ml)} = \frac{\text{gewünschte MOI} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{Zelle}} \right) \times \text{Gesamtzellzahl}}{\text{Virustiter} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{ml}} \right)} \quad 3.4$$

Für Aktivitätsuntersuchungen wurden 20 ml Sf9-Zellen in 100 ml Erlenmeyerkolben infiziert und für 72 h bei 27 °C bei 140 rpm schüttelnd inkubiert. Für die Infektion von Sf9-Zellen zur Proteinanreinigung wurden 500 ml Zellen in 5 Liter Kolben mit der entsprechenden Virusmenge verwendet.

3.3.1.5 Proteingewinnung aus infizierten Sf9-Zellen

Die infizierten Sf9-Zellen wurden bei 4000 rpm für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet aus ursprünglich 20 ml Zellsuspension wurde in 2 ml TEA-Lysispuffer resuspendiert und in neue Reaktionsgefäße überführt. Zur effektiven Protease-Inhibition wurden zuvor 50 ml TEA-Lysispuffer mit einer Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette (PIC) versetzt. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Ultraschall-Homogenisator (4 x 4 sec; 50 % Leistung) unter Eiskühlung lysiert. Zur Abtrennung der Zellkerne und der zerstörten Zellbestandteile wurden die Ansätze für 30 min bei 21.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wird im Folgenden als cytosolische Fraktion bezeichnet. Für die Proteingewinnung zur Anreinigung wurden 500 ml infizierte Zellsuspension abzentrifugiert und das Pellet in 15 ml TEA-Lysispuffer inklusiver einer PIC-Tablette resuspendiert. Die Ultraschallbehandlung erfolgte bei 16 x 4 sec und 50 % Leistung. Anschließend wurde Avidin in einer Konzentration von 2 nM zugegeben und für 30 min bei 4 °C schüttelnd inkubiert, um Biotin aus dem Medium abzufangen. Die Zentrifugation erfolgte bei 15.000 x g für 2 h bei 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und für weiterführende Untersuchungen eingesetzt.

Zur Gewinnung der Hämoxygenasen, der humanen Biliverdin Reduktase und der NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase wurde TEA-Lysispuffer ohne den Zusatz von DTT verwendet.

3.3.2 Rekombinante Proteinexpression durch HEK293-Zellen

3.3.2.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden aus Primärzellen einer humanen embryonalen Niere durch Transformation mit dem Adenovirus 5 etabliert (Graham et al., 1977).

Die Zellen wurden als Monolayer in *Dulbeccos modified eagle medium* (DMEM) mit 10 % FBS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C unter CO₂-Begasung (5 %) kultiviert. Alle 3-4

Tage sobald die Zellen einen konfluenten Zellrasen ausgebildet hatten, wurden sie vom Flaschenboden gelöst, indem sie mit Trypsin/EDTA für 2 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden, bevor das Trypsin/EDTA in fünffachem Überschuss an Zellmedium abgestoppt wurde. Anschließend wurden die Zellen 1:5 in frischem Medium verdünnt. Die Verdopplungszeit der HEK293-Zellen lag unter optimalen Bedingungen bei 24-30 h.

3.3.2.2 Transfektion von HEK293-Zellen zur Proteinexpression

Zur Transfektion von HEK293-Zellen wurde entweder das kationische Lipid Lipofectamine® LTX Reagenz inklusive Plus-Reagenz der Fa. Invitrogen oder das kationische Polymer Polyethylenimin (PEI) verwendet (Boussif et al., 1995, Thomas and Klibanov, 2003). Für die Untersuchungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurden spezielle 24-well Imaging Platten mit Glasboden verwendet. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von $7,5 \times 10^4$ Zellen pro well in 500 µl DMEM ohne Phenolrot mit 10 % FBS und 1 % Pen/Strep ausgesät und für 24 h im Brutschrank (5 % CO₂) kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Lipofectamine® LTX transfiziert. Dafür wurden 0,5 µl DNA in einer Konzentration von 1 µg/µl mit 0,5 µl Plus Reagenz in 50 µl DMEM ohne Phenolrot und ohne Serum und Antibiotika vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1,5 µl Lipofectamine® LTX zugegeben, gut gemischt und weitere 30 min lang bei Raumtemperatur inkubiert, bevor das Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben wurde. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen für die Versuche eingesetzt werden. Wenn eine Doppeltransfektion mit zwei DNAs (jeweils 0,5 µg) durchgeführt wurde, wurde die Menge an Plus-Reagenz und Lipofectamine® LTX entsprechend verdoppelt.

Für die Durchführung des Zytotoxizitätstestes wurde eine Titerplatte mit 96 Vertiefungen gewählt. Die Zelldichte betrug hierfür 1×10^4 Zellen/Vertiefung. Für die Transfektion wurde PEI verwendet nach einem Protokoll von Schirrmann und Büssow (Kontermann and Dübel, 2010). Pro Ansatz wurden 30 µl DMEM Medium ohne Phenolrot mit 10 % FBS und 1 % Pen/Strep mit 1 µg DNA (ohne DNA für die Kontrolle) versetzt und diese Lösung zu einem Gemisch aus 30 µl Medium und 4 µl PEI-Lösung gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zu gleichen Teilen auf vier Vertiefungen verteilt.

3.3.3 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt kann durch die Messung der Absorption nach Bindung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue bestimmt werden. Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm, die Intensität ist hierbei abhängig von der Menge des gebundenen Proteins (Bradford, 1976). Die Gehaltsmessung erfolgte in einer 96-well Platte. Die Proteinlösungen wurden für die Messung 1:50 in PBS verdünnt. 10 µl dieser Lösung wurden mit 190 µl

Bradford-Reagenz versetzt, kurz geschüttelt und nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln in einem Platten-Reader vermessen. Als Standard dienten definierte Lösungen von Rinderserumalbumin (BSA) in PBS. Für Proteinbestimmungen bei kleinen Ansätzen wurde zur Einsparung des Proteins der Gehalt am Nanophotometer gemessen. Hierbei wurde das Verhältnis der Absorptionen bei 280 nm und 260 nm bestimmt gegen das Lösungsmittel als Nullabgleich. Die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan absorbieren Licht bei der Wellenlänge 280 nm, störende Nukleinsäuren konnten durch die Messung bei 260 nm eliminiert werden. Der Proteingehalt konnte durch folgende Formel berechnet werden (Warburg and Christian, 1941):

$$\text{mg Protein pro ml} = 1,55 \times A_{280}^{1\text{cm}} - 0,76 \times A_{260}^{1\text{cm}} \quad 3.5$$

A = Absorption bei den Wellenlängen 280nm und 260 nm

3.3.4 Proteinanreinigung mit Hilfe eines *Strep-tags*[®] II

Zur Anreinigung der rekombinant hergestellten Proteine wurde eine Affinitätschromatografie mit Hilfe des *Strep-tag*[®]/*Strep-Tactin*[®] Systems der Fa. IBA, BioTAGnology (Göttingen) durchgeführt, vgl. Abbildung 3.3 (Schmidt and Skerra, 1994, Skerra and Schmidt, 2000, Schmidt and Skerra, 2007). Hierfür wurde der *Strep-tag*[®] II optional an den Amino-Terminus oder den Carboxy-Terminus des gewünschten Proteins kloniert. Der *Strep-tag*[®] II ist ein Oligopeptid bestehend aus den acht Aminosäuren WSHPQFEK und weist eine Optimierung in seiner Bindungsseite auf (Korndorfer and Skerra, 2002). Als stationäre Phase wurde *Strep-Tactin*[®] verwendet, welches eine Weiterentwicklung des Streptavidins darstellt und eine deutlich höhere Bindungsaffinität aufweist (Voss and Skerra, 1997). Die Verdrängung von der stationären Phase erfolgte durch Desthiobiotin, ein reversibler Ligand und ein Analogon des natürlich vorkommenden Biotins. Für die Anreinigungen wurde das ÄKTA-Purifier[™] System der Fa. GE Healthcare (Freiburg) verwendet. Die Leersäulen Tricorn[™] Empty High Performance 10/20 Columns, welche mit dem Säulenmaterial *Strep-Tactin*[®] Superflow[®] high capacity befüllt wurden, waren ebenfalls von GE Healthcare. Die Regeneration der Säule erfolgte mit Hilfe eines HABA-haltigen Regenerationspuffers. HABA verursacht im gebundenen Zustand einen Farbumschlag von Gelb nach Rot. Die rote Farbintensität verdeutlichte zusätzlich die Regenerationskapazität der Säule. Das gebundene HABA wurde durch Waschpuffer wieder von der Säule entfernt.

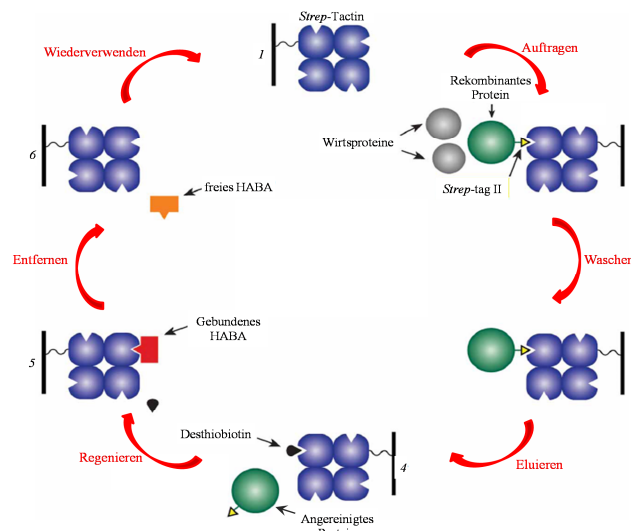


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Anreinigung mit Hilfe des Strep-tag®/Strep-Tactin® Systems. Die Abbildung wurde modifiziert und ins Deutsche übersetzt (Schmidt and Skerra, 2007).

3.3.4.1 Anreinigung der HOs

Die Cytosole, die die *Strep-tag*® II-verknüpften HO-Varianten enthielten wurden für die Abtrennung bei der Anreinigung störender Partikel mit einem 0,45 µm Filter filtriert. Von dem Filtrat wurde ein Aliquot für die Proteinbestimmung und für spätere Vergleichsmessungen abgenommen. Der Rest wurde auf das ÄKTA-Purifier™ System aufgetragen. Die verwendeten Wasch- und Elutionspuffer enthielten kein DTT. Die Probe wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die mit Waschpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und anschließend mit fünf Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch fünf Säulenvolumina Elutionspuffer mit 2,5 mM Desthiobiotin ebenfalls bei einer Flussrate von 1 ml/min. Das Eluat wurde in Fraktionen von 0,5 ml gesammelt. Die Fraktionen, die eine Absorption bei 280 nm zeigten, wurden zusammengeführt und anschließend mit Amicon Ultra Filter Ultracel® (Millipore, Billerica, USA) mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa auf ein Volumen von ca. 500 µl durch Zentrifugieren bei 4000 rpm und 4 °C eingengt. Anschließend wurde am Nanophotometer die Proteinkonzentration gegen Elutionspuffer als Nullabgleich bestimmt. Die Proteinlösungen wurden für weitere Untersuchungen direkt eingesetzt. Die Regeneration der Säule erfolgte mit 15 Säulenvolumina Regenerationspuffer und acht Säulenvolumina Waschpuffer.

3.3.4.2 Anreinigung der NOsGC

Die Anreinigung der NOsGC (α_1/β_1 -S) und der Mutante α_1 C15S/ β_1 -S erfolgte analog der unter 3.3.4.1 beschriebenen Anreinigung der HO-Varianten. Als Unterschiede sind hier zu nennen, dass der Wasch- und Elutionspuffer 10 mM DTT enthielt und die Proteindetektion des Eluats nicht nur bei 280 nm sondern auch bei 430 nm erfolgte. Dies gab schon einen ersten Hinweis auf die Hämhaltigkeit des Enzyms. Die

gesammelten Fraktionen wurden anschließend mit Amicon Ultra Filter Ultracel® (Millipore, Billerica, USA) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa eingeeengt. Die eingeeengten Proben wurden mit TEA-Lysispuffer (mit 10 mM DTT) auf eine Konzentration von 2,5 ng/µl eingestellt und mit 10 % (v/v) Glycerol und 0,5µg/µl BSA versetzt. Aliquots zu 250 µl wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.3.5 Gelfiltrationschromatografie

Die Gelfiltrationschromatografie ist eine Größenausschlusschromatografie, bei der Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt werden können. Größere Proteine wandern hierbei schneller durch die Säule, da diese weniger gut in die Poren der Säulenmatrix eindringen können und weniger stark zurückgehalten werden als kleinere Proteine. Für Untersuchungen der HOs bezüglich Dimerbildung, Bildung von Abbauprodukten oder Proteinkomplexbildung mit der CPR wurde die Gelfiltrationssäule Superdex™ 200 10/300 GL der Fa. GE Healthcare verwendet. Als Säulenmaterial diente ein Gemisch von quervernetzter Agarose und Dextran. Von der angereinigten Probe wurden 150 µg Protein auf eine Probenschleife mit einem Volumen von 500 µl aufgetragen. Zum Auftragen der Probe auf die, mit fünf Säulenvolumen äquilibrierte, Säule wurde die Probenschleife mit 2 ml Gelfiltrationspuffer gespült. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Anschließend wurde mit 1,5 Säulenvolumina eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 0,5 ml aufgefangen. Durch Messung der Absorption bei 280 nm konnten die Fraktionen identifiziert werden, die Proteine enthielten und dadurch deren Elutionsvolumen bestimmt werden. Die Größenbestimmung erfolgte durch Vergleich mit Standardproteinen, die in einem Kalibrationskit für niedermolekulare Proteine der Fa. GE Healthcare enthalten waren und mit denen die Säule kalibriert wurde (s. Abbildung 3.4). Zur qualitativen Bestimmung wurden die Fraktionen, die Protein enthielten, gesammelt, mit Amicon Ultra- 0,5 ml 10K Ultracel Säulen eingeeengt und für die Analyse mit Hilfe der SDS-Page eingesetzt.

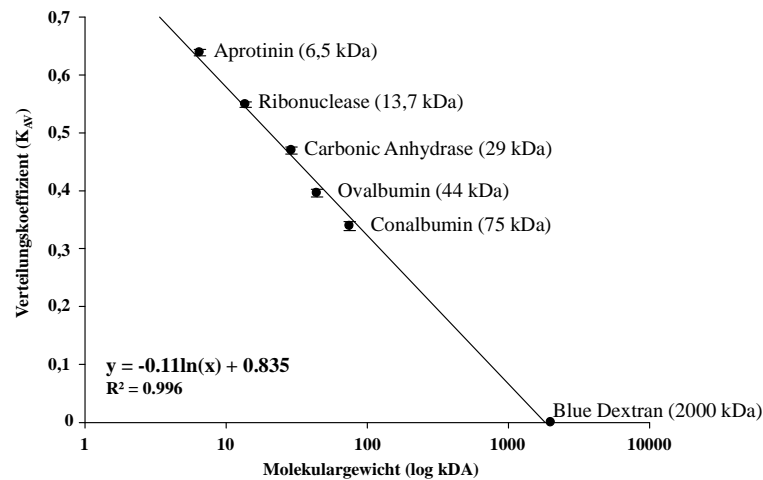


Abbildung 3.4: Kalibrationsgerade der Gelfiltration. Zur Bestimmung wurden drei unabhängige Läufe vorgenommen. Aufgetragen ist der Verteilungskoeffizient (K_{AV}) gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichtes (log kDa). Der Verteilungskoeffizient ist abhängig von dem Elutionsvolumen der Proteine, dem Totvolumen (bestimmt durch das Elutionsvolumen des Blue Dextrans) und des Bettvolumens der Säule. Aus der Standardgeradengleichung kann mit Hilfe des Elutionsvolumen der Proteine die Größe errechnet werden.

3.3.6 Enzymaktivitätsbestimmungen

3.3.6.1 Bestimmung der Hämoxygenase-Aktivität

Das zugrunde liegende Prinzip der Methode ist die photometrische Gehaltsbestimmung von Bilirubin. Dieses entsteht nach dem Abbau von Häm durch die HO zu Biliverdin und dessen anschließender Reduktion durch die BVR. Die zu untersuchenden Cytosole, Homogenisate oder angereinigten Proteine wurden mit einem Reaktionsgemisch bestehend aus Hämin (25 μ M), NADPH (1 mM), Glucose-6-Phosphat (1 mM) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,375 U), CPR- und hBVR-Cytosol (jeweils 27,5 μ l) in einem Phosphat-Magnesium-Puffer versetzt. Das Glucose-6-Phosphat und die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase dienen als regenerierendes System für NADPH. Von den angereinigten Proteinen wurden 25 μ g Protein in einem Volumen von 200 μ l und von den Cytosolen oder Homogenisaten jeweils 200 μ l direkt eingesetzt. Durch die vorher bestimmte Proteinkonzentration ergab sich so die Proteinmenge. Das Ansatzvolumen insgesamt betrug 500 μ l. Die Proben wurden anschließend für eine Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 350 μ l Chloroform gestoppt. Durch die Kombination aus starkem Vortexen für eine halbe Minute und 5-minütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm, welches einmal wiederholt wurde, konnte das gebildete Bilirubin in die Chloroformphase extrahiert werden. Diese wurde dann gegen Chloroform als Nullabgleich bei 454 nm und 530 nm photometrisch vermessen. Die Berechnung der gebildeten Bilirubinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes und dem molaren

Extinktionskoeffizient von $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Maines and Kappas, 1974). Durch Berücksichtigung des eingesetzten Extraktionsvolumen, der Proteinmenge und der Inkubationszeit wurde aus der Bilirubinkonzentration die Enzymaktivität der HO mit der Einheit pmol/h/mg berechnet.

$$\text{Lambert-Beer'sches-Gesetz} \quad c = \frac{A}{\epsilon d} \quad 3.6$$

c = Bilirubinkonzentration (mM)

A = gemessene Absorption

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient ($40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

$$\text{Berechnung der spezifischen Enzymaktivität} \quad a = \frac{c \times V \times 1000}{t \times P} \quad 3.7$$

a = spezifische Enzymaktivität der HO (pmol/h/mg)

c = Bilirubinkonzentration (mM)

V = Extraktionsvolumen (μl)

t = Inkubationszeit (h)

P = eingesetzte Proteinmenge (mg)

3.3.6.2 Bestimmung der Guanylyl-Cyclase-Aktivität

Die Bestimmung der GC-Aktivität beruht auf der Umsetzung von radioaktiv markiertem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ zu $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ cGMP}$. Die Methode wurde von Schultz und Böhme 1984 beschrieben (Schultz and Böhme, 1984). Zur Untersuchung wurden entweder 20 μl Cytosol oder angereinigtes Protein (2,5 ng/ μl) in einem Gesamtreaktionsvolumen von 100 μl eingesetzt. Die Bestandteile des Reaktionsansatzes waren 0,5 mg Kreatinkinase, 50 mM TEA/HCl pH 7,4, 1 mM IBMX, 3 mM DTT, 3 mM MgCl_2 , 5 mM Kreatinphosphat, 1 mM cGMP und 0,5 mM GTP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$. IBMX wurde als Hemmer eventuell vorhandener Phosphodiesterasen eingesetzt zur Erhöhung der gebildeten $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-cGMP}$ -Konzentration. Aus diesem Grund und auch zur Erhöhung der Wiederfindungsrate des $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-cGMP}$ wurde zusätzlich in dem Reaktionsansatz nicht radioaktives cGMP eingesetzt. DTT diente als Reduktionsmittel und das MgCl_2 als Co-Faktor für die NOsGC. Kreatinphosphat und Kreatinkinase dienten als GTP regenerierendes System. Weiterhin wurden 10 μl DEA/NO oder andere Modulatoren eingesetzt. Zur Bestimmung der Basalaktivitäten wurde das jeweilige Lösungsmittel eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 10 min lang bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500 μl 120 mM Zinkacetat abgestoppt. Durch die Zugabe von 500 μl Natriumcarbonat entstand Zinkcarbonat, welches zur Kopräzipitation der entstandenen

5'-Nukleotide führte (Chan and Lin, 1974). Zum Abtrennen der Präzipitate wurden die Proben bei 13000 rpm für 8 min zentrifugiert. Zum Anreinigen des gebildeten [α - 32 P]-cGMPs wurden jeweils 900 μ l des Überstandes auf, mit Aluminiumoxid gefüllte, Tropfsäulen aufgetragen (White, 1974). Diese wurden vorher mit 0,1 M Perchlorsäure zur Verminderung des Hintergrundes angesäuert (Jakobs et al., 1976). Die Säulen wurden zweimal mit Reinstwasser gewaschen und dann das [α - 32 P]-cGMP durch die Zugabe von 5 ml 250 mM Natriumacetat (pH 6,5) eluiert. Das Eluat wurde in Szintillationsgefäße aufgefangen, die dann zur Vermessung in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler eingesetzt wurden. Dieser misst die von der Probe ausgehende Cerenkov-Strahlung. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde folgende Formel verwendet:

$$v = \frac{C - C_0}{C_t} \times \frac{S}{W \times RG \times P \times t} \quad 3.8$$

| | |
|-------|---|
| v | spezifische Aktivität (nmol cGMP / min / mg Protein) |
| C | Zählrate der Probe (cpm) |
| C_0 | Zählrate des Leerwertes (cpm) |
| C_t | Zählrate des eingesetzten [α - 32 P]-GTP (cpm) |
| S | Menge des eingesetzten Substrates 5'-GTP (nmol) |
| W | Wiederfindungsrate des cGMPs |
| RG | Reinheitsgrad des eingesetzten [α - 32 P]-GTP |
| P | Proteinmenge pro Ansatz |
| t | Inkubationsdauer (min) |

Der in der Formel aufgeführte Leerwert (C_0) wurde durch die Vermessung eines Probenansatzes ohne Protein bestimmt. Dieser dient dazu, nicht-enzymatisch entstandenes [α - 32 P]-cGMP zu detektieren, welches von der gemessenen Zählrate abgezogen werden kann (Kimura and Murad, 1974b). cGMP kann während der Präzipitation mit Zinkcarbonat zu einem geringen Teil mitausgefällt werden. Weiterhin muss bei der Anreinigung über die Säule immer mit einem Verlust gerechnet werden. Um dies bei der Berechnung berücksichtigen zu können, wurde die sogenannte Wiederfindungsrate (W) bestimmt. Dazu wurde [α - 32 P]-cGMP als Ausgangsnukleotid eingesetzt und dies dann ins Verhältnis zur gemessenen Menge gesetzt. Die Wiederfindungsrate betrug $0,5 \pm 0,05$, der Reinheitsgrad des eingesetzten [α - 32 P]-GTP (RG) nach Herstellerangaben 0,9. In der Arbeitsgruppe wurden spezifische Aktivitäten nur berechnet, wenn die Zählrate der Probe mindestens doppelt so groß war wie die des Leerwertes und geringer war als 10 % der Zählrate des eingesetzten [α - 32 P]-GTPs.

3.3.7 Proteinnachweis

3.3.7.1 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur Auftrennung von Proteinen und Proteingemischen verwendet. Durch die Zugabe von SDS werden die Proteine einheitlich negativ geladen und wandern nach Anlegen eines elektrischen Stroms zur Anode. Durch die einheitliche Ladung erfolgt die Auftrennung ausschließlich nach ihrer Molekülmasse. Kleinere Moleküle wandern hierbei schneller als große. Zur Auftrennung der Proteine wurde die Methode nach Laemmli verwendet (Laemmli, 1970). Zur schärferen Bandenauftrennung wurde ein diskontinuierliches System aus einem 6 %-igem Sammelgel und einem 10 %-igem Trenngel verwendet. Die beiden Gele unterschieden sich durch ihren pH-Wert, die Ionenstärke und Porengröße, was zu einer Aufkonzentrierung der Probe im Sammelgel führte, bevor die Auftrennung im Trenngel erfolgte. Von den angereinigten Proben wurden 1-5 µg Protein untersucht, von den Sf9-Cytosolen bzw. -Homogenisaten je 80 µg. Die Proben wurden mit SDS-Page Probenpuffer versetzt. Das darin enthaltene β-Mercaptoethanol spaltete die Disulfidbrücken und zerstörte die Tertiärstruktur der Proteine. Nach Auftragung auf das Gel wurden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Stroms bei 100 V aufgetrennt.

3.3.7.2 Western-Blot und Immundetektion

Das Western-Blot Verfahren dient zur Übertragung von Proteinen aus SDS-Gelen auf Trägermembranen durch Wanderung im elektrischen Feld. Die Proteine wandern auf Grund ihrer negativen Ladung in Richtung der Anode. Auf diesem Weg bleiben sie durch hydrophobe Wechselwirkungen auf der Trägermembran haften (Towbin et al., 1979). Der Transfer der Proteine erfolgte mit Hilfe des *Semi-Dry Blotting*-Verfahrens auf Nitrocellulosemembranen (Kyhse-Andersen, 1984). Hierfür wurde für 2 h eine Stromstärke von 2-3 mA/cm² angelegt. Nach erfolgter Transferkontrolle der Proteine mit Hilfe der Ponceau S Färbung (siehe Kapitel 3.3.7.3) wurden die unspezifischen Bindestellen der Membranen durch Schwenken in einer 5 %-igen Milchpulverlösung in TBST eine Stunde lang bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank blockiert. Für die Immundetektion wurden die Membranen zuerst mit dem Primärantikörper in TBST-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen des Antikörpers wurde dreimal 10 min mit TBST gewaschen, bevor mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in TBST nach Herstellerangaben) eine weitere Stunde inkubiert wurde. Dieser war mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und richtete sich spezifisch gegen das IgG aus dem Erzeugerorganismus des Primärantikörpers. Nach Entfernung des ungebundenen Antikörpers durch Waschen mit TBST wurden die Membranen mit Hilfe des Lumi-Light^{Plus} Western-Blottings Kit der Fa. Roche nach Herstellerangaben detektiert. Das zu Grunde liegende Prinzip ist die Umsetzung von Luminol durch die Meerrettichperoxidase in Anwesenheit von H₂O₂,

wodurch Chemilumineszenz erzeugt wird. Diese konnte dann mit der ECL Dokumentationsanlage der Fa. Intas dokumentiert werden. Die densitometrische Auswertung der detektierten Banden erfolgte mit dem Computerprogramm MCID Analysis™.

Die HO- und CPR- Detektion erfolgte nach einem leicht abgewandelten Protokoll, wobei die Antikörper in einer 1 %igen Milchpulverlösung in TBST verdünnt wurden und die Waschung mit 5 %igem Milchpulver und TBST erfolgte.

3.3.7.3 Ponceau S Färbung

Die Kontrolle des Proteintransfers auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte mit dem Azo-Farbstoffes Ponceau S, der die Proteine unspezifisch anfärbt. Nach 5-minütiger Inkubation der Nitrocellulose-Membranen mit der Ponceau S Lösung, wurde der Überschuss an Farbstoff durch kurzes Waschen mit Reinstwasser wieder entfernt. Anschließend wurden die Membranen getrocknet und zur Dokumentation am Computer eingescannt. Die Entfernung des Farbstoffes von den Proteinen erfolgte durch Waschen mit TBST.

3.3.7.4 Coomassie-Gelfärbung

Zur unspezifischen Anfärbung der nach der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine direkt im Gel kann der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 verwendet werden. Die Methode nach Kang bietet hier die Vorteile, dass sie eine hohe Sensitivität vergleichbar mit der Silberfärbung aufweist und gleichzeitig auf die Verwendung von giftigem Methanol durch den Austausch mit Ethanol verzichtet werden kann (Kang et al., 2002). Die Gele wurden zweimal 10 min lang mit Reinstwasser gewaschen, bevor sie mit der Coomassie-Färbelösung über Nacht schwenkend eingefärbt wurden. Durch Austausch der Färbelösung mit der Coomassie-Waschlösung und anschließender zweistündiger Inkubation konnte der Hintergrund der Gele wieder entfärbt werden. Die Gele wurden mit Hilfe eines Durchlicht-Scanners dokumentiert.

3.3.8 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie beschreibt eine spezielle Art der Lichtmikroskopie. Durch die Verwendung einer Lochblende (*pinhole*) im Strahlengang des detektierten Lichtes, kann Licht, das außerhalb der Fokusebene entstanden ist, ausgeblendet werden. Dadurch wird die Schärfentiefe verringert und die Auflösung verbessert. Eine Besonderheit hierbei ist, dass zu keinem Zeitpunkt der Messung ein vollständiges Bild entsteht, sondern nur kleine Bildpunkte einzeln („rasterartig“) abgefahren werden. Das resultierende Bild wird nur am Computer erstellt. Der Vorteil hierbei ist, dass die Betrachtung in verschiedenen Ebenen möglich ist. Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nutzt als Lichtquelle einen Laser, der nur eine Wellenlänge ausstrahlt,

womit Fluoreszenzproteine angeregt werden können. Diese können z.B. an zu untersuchende Proteine fusioniert werden. Die Methode eignet sich besonders zur Untersuchung in lebenden Zellen (*Live-Cell-Imaging*). Für die in Kapitel 3.3.9, 3.3.10.2 und 3.3.12 beschriebenen Versuche wurde das inverse konfokale Laser-Scanning-Mikroskop Ti-E mit dem A1-System der Fa. Nikon, ausgestattet mit einer Inkubationskammer (Okolab, Neapel, Italien) zur Regelung der Temperatur, verwendet. Für die Messungen standen verschiedene Argon-Laser (MELLES-GRIOT®, Melles-Griot, Carlsbad, USA) zur Verfügung, deren Auswahl sich nach den verwendeten Fluoreszenzproteinen richtete. Die Messung des GFPs erfolgte bei einer Anregung von 488 nm unter Verwendung des Bandpass-Filters 525/50 nm, die des CFPs bei 457 nm (Bandpass-Filter 482/35 nm) und die des YFPs bei 514 nm (Bandpass-Filter 540/30 nm). Die Größe des Scanbereiches betrug 512 x 512 Bildpunkte und die optische Schichtdicke lag zwischen 0,35 und 0,7 µm.

3.3.8.1 Fluoreszierende Proteine

Das erste beschriebene Fluoreszenzprotein war das GFP, welches aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura et al., 1962). Seit diesem Zeitpunkt wurden noch viele weitere fluoreszierende Proteine, häufig in lebenden Organismen wie Quallen oder Korallen, entdeckt, oder die vorhandenen Proteine molekularbiologisch verändert, so dass heute eine große Farbpalette an Fluoreszenzproteinen zur Verfügung steht (Tsien, 1998). Die molekularbiologischen Veränderungen waren vor allem nach der Aufklärung der Struktur und der Klonierung des GFP-Gens möglich (Prasher et al., 1992). Wegen ihrer Verdienste um die Entdeckung und Erforschung der Proteine wurde den Forschern O. Shimomura, M. Chalfie und R. Tsien 2008 der Nobelpreis für Chemie verliehen (Nobelprize.org).

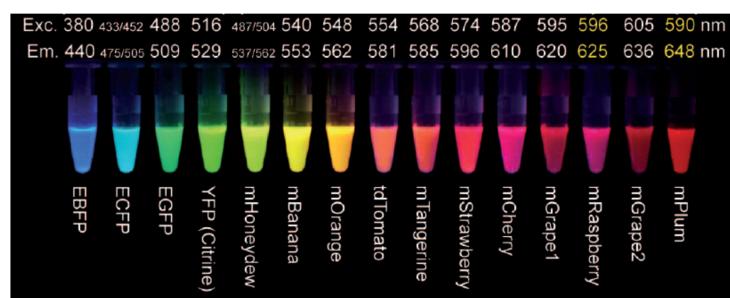


Abbildung 3.5: Übersicht über die vorhandenen Fluoreszenzproteine mit ihren Anregungs- und Emissionsmaxima (Stand 2004). Quelle: Deutsche Übersetzung „Die Farbpalette der fluoreszierenden Proteine“ des Nobel-Vortrages von Tsien, 2009.

3.3.9 Translokationsversuche der Hämoxygenase

HEK293-Zellen wurden wie in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben ausgesät und mit GFP-HO-1, GFP-HO-1ΔC266, GFP-HO-2 und GFP-HO-2ΔC289 transfiziert. Zur Untersuchung des Einflusses von CPR auf die Translokation wurden

Doppeltransfektionen von YFP-fusionierten HO-Konstrukten (s. GFP-markierte Formen) und CPR-CFP vorgenommen. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Zell-Brutschrank wurden die Zellen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei den, für das Fluoreszenzprotein spezifischen, Wellenlängen (s. Kapitel 3.3.8) mit einem 60x Ölimmersionsobjektiv (Plan Apo VC 60xOil; NA 1,4, Nikon) bei 37 °C untersucht. Pro Vertiefung wurde ein Foto aufgenommen, welches dem Zeitpunkt 0 h entsprach. Dies diente zur Überprüfung der Vitalität der Zellen und der Transfektionseffizienz. Anschließend wurden die Platten entweder im Hypoxie-Brutschrank (1 % O₂, 5 % CO₂ und 94 % N₂) oder zur Kontrolle im Standard-Zell-Brutschrank inkubiert. Nach 21 h und 42 h Inkubation wurden die Zellen erneut am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet und fotografiert.

Für die Translokationsversuche unter Hämin wurden Zellen mit GFP-HO-1, GFP-HO-2 und GFP-HO-2 C265S/C282S transfiziert. Nach dem Betrachten zum Zeitpunkt 0 h wurde eine 10 µM oder 100 µM Häminlösung in DMSO auf die Zellen getropft. Anschließend erfolgte die Inkubation im Standard-Zell-Brutschrank für 42 h, bevor die Translokation untersucht wurde.

3.3.10 Bestimmung der FRET-Effizienzen

FRET steht für Förster-Resonanz-Energietransfer und wurde erstmals von Theodor Förster im Jahre 1948 beschrieben (Förster, 1948). Es handelt sich hierbei um einen physikalischen Prozess, bei dem strahlungsfrei durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ein Energieübertrag von einem angeregten Donor auf einen Akzeptor stattfindet. Handelt es sich hierbei um Fluoreszenzfarbstoffe, so kann man auch von einem Fluoreszenzresonanzenergietransfer sprechen. Eine Grundvoraussetzung für den Energieübertrag ist, dass sich beide Fluorophore in einem räumlichen Abstand von 10-80 Å befinden (s. Abbildung 3.6).

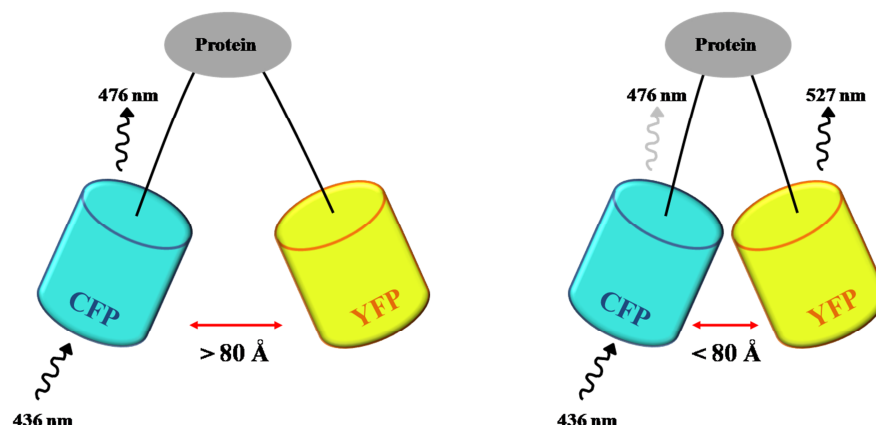


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Auftretens von FRET am Beispiel der Fluoreszenzproteine CFP und YFP. Ist der Abstand zwischen den beiden Fluoreszenzproteinen größer 80 Å findet kein Energietransfer statt (linke Abbildung), ist er geringer, kann von dem angeregten Fluorophor (CFP) Energie auf den Akzeptor (YFP) übergehen. Das Emissionsmaximum verschiebt sich von 476 nm nach 527 nm (rechte Abbildung).

Die Intensität des Übertrags ist dabei proportional zu dem Kehrwert der sechsten Potenz des Abstandes. Dies kann man sich als „optisches Nanometermaß“ zu Nutze machen (Stryer and Haugland, 1967). Eine weitere Voraussetzung für das Auftreten von FRET ist, dass sich das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. In den Versuchen dieser Arbeit wurde das Fluoreszenzpaar verbessertes cyan-fluoreszierendes Protein (ECFP) und verbessertes gelb-fluoreszierendes Protein (EYFP) verwendet, deren Spektren in Abbildung 3.7 abgebildet sind.

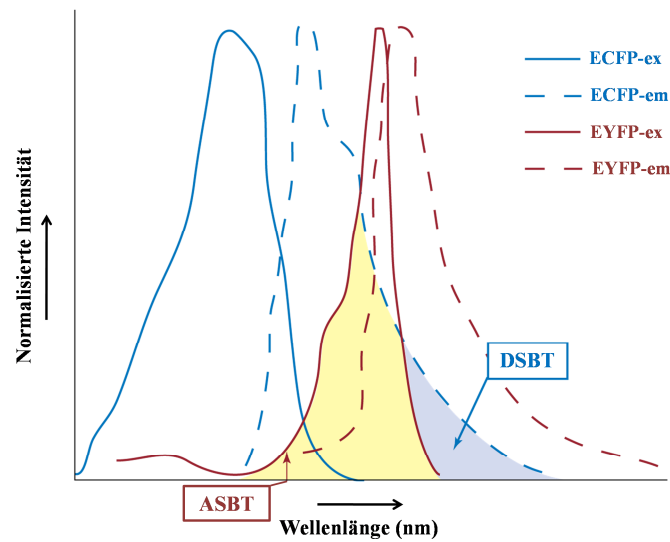


Abbildung 3.7: Anregungs- und Emissionsspektren von Donor (ECFP) und Akzeptor (EYFP) (modifiziert nach Wallrabe and Periasamy, 2005). Die durchgezogenen Linien beschreiben die Anregungsspektren und die gestrichelten die Emissionsspektren. Der gelbe Bereich bezeichnet die spektrale Überlappung von Donoremissionspektrum und Akzeptoranregungsspektrum als Grundvoraussetzung eines FRET-Paares. ASBT: Akzeptor spektraler *Bleedthrough*; DBST: Donor spektraler *Bleedthrough* (Beschreibung s. 3.3.10.1)

Die Bestimmung des FRETs ist auf Grund des strahlungsfreien Energieübertrages nicht direkt möglich, weshalb man sich an Alternativmethoden bedienen kann: z.B. kann die Abnahme der Donorstrahlungsintensität gemessen werden, welche reduziert ist, wenn ein Übergang auf den Akzeptor stattgefunden hat. Setzt man diese in Bezug zu der Strahlungsintensität in Abwesenheit eines Akzeptors, so erhält man die FRET-Effizienz (siehe auch Kapitel 3.3.10.1). Auf Grund der Verkürzung der Verweildauer des Donors im angeregten Zustand bei Auftreten eines Energietransfers kann die Messung dieser Dauer, die als Fluoreszenzlebenszeit bezeichnet wird, ebenfalls als Maß für die FRET-Effizienz verwendet werden (s. Kapitel 3.3.10.2). Die erwähnten Methoden können zur Bestimmung von intermolekularem (zwischen zwei Molekülen) und intramolekularem (innerhalb eines Moleküls) FRET verwendet werden, abhängig davon, ob die Fluoreszenzproteine an ein oder zwei Proteine fusioniert werden.

3.3.10.1 FRET Messungen am Spektrofluorimeter

Zur Bestimmung der FRET Effizienzen wurde die „sensitized emission“-Methode verwendet. Die Methode beruht auf der Messung der Fluoreszenzabnahme des Donors, die auftritt, wenn eine strahlungsfreie Energieübertragung von dem angeregten Donor (CFP) auf den Akzeptor (YFP) stattgefunden hat (FRET). Hierfür wurden die Messungen in drei Kanälen durchgeführt: Im Donorkanal wurden die Proben bei 436 nm angeregt und die Emission bei 476 nm gemessen. YFP wurde im Akzeptorkanal bei der Anregungswellenlänge 515 nm und der Emissionswellenlänge 527 nm vermessen. Daraus ergaben sich dann die Messwellenlängen für den FRET-Kanal, bei dem die Anregung bei 436 nm erfolgte und die Emission bei 527 nm gemessen wurde. Die Anregungs- und Emissionsschlitze betrugen jeweils 5 nm. Die Aufnahmen wurden an einem Varian-Spektrofluorimeter bei 37 °C durchgeführt. Die Temperatur wurde durch einen temperierbaren Peltier-Küvettenhalter konstant gehalten. Die untersuchten Cytosole und Homogenisate wurden aus Sf9-Zellen gewonnen, die mit den jeweiligen Baculoviren für HO-1; HO-1ΔC266; HO-2; HO-2ΔC289 zusammen mit dem für die CPR (jeweils gegensätzlich mit CFP oder YFP markiert) infiziert wurden. Die Proben wurden mit TEA-Lysispuffer so lange verdünnt, bis eine gleichbleibende Fluoreszenzintensität im YFP-Kanal erreicht wurde. Zum Ausschluss von unspezifischer Fluoreszenz der Sf9-Komponenten wurde der Hintergrund von uninfizierten Zellen in allen drei Kanälen bestimmt. Dieser verhält sich proportional zur Proteinmenge, welche von jeder untersuchten Probe bestimmt wurde. Die Hintergrundintensitäten wurden von den gemessenen Intensitäten subtrahiert, welche dann zur Berechnung des korrigierten FRETs (FRET^c) verwendet wurden (Youvan et al., 1997):

$$FRET^c = FRET - (0,446 \times CFP) - (0,0177 \times YFP) \quad 3.9$$

FRET = um den Hintergrund subtrahierte Fluoreszenzintensität im FRET-Kanal

CFP = um den Hintergrund subtrahierte Fluoreszenzintensität im CFP-Kanal

YFP = um den Hintergrund subtrahierte Fluoreszenzintensität im YFP-Kanal

0.446 = Donor „Bleedthrough“ Faktor

0.0177 = Akzeptor „Bleedthrough“ Faktor

Die Konstanten 0,446 und 0,0177 sind sogenannte „Bleedthrough“ Faktoren und beschreiben den Anteil an Fluoreszenzintensität, der im FRET Kanal gemessen werden kann, wenn die reine Donor- oder Akzeptorprobe vermessen wird. Sie stellen das Verhältnis aus FRET-Kanal-Intensität zu Donor-Kanal-Intensität (Donor „Bleedthrough“) oder aus FRET-Kanal-Intensität zu Akzeptor-Kanal-Intensität (Akzeptor „Bleedthrough“) dar. Die bestimmten Werte entsprechen denen, die in der Literatur beschrieben sind (Efendiev et al., 2006). Das korrigierte FRET beschreibt

somit den reinen Energietransfer von der Donor- auf die Akzeptorprobe. Die FRET-Effizienz (E) kann im Anschluss mit folgender Formel bestimmt werden (Elangovan et al., 2003, Wallrabe and Periasamy, 2005):

$$E = 1 - \left[\text{CFP} / \left(\text{CFP} + \text{FRET}^c \times \frac{Q_d}{Q_a} \right) \right] \quad 3.10$$

CFP = um den Hintergrund subtrahierte Fluoreszenzintensität im CFP-Kanal

Q_d = Quantenausbeute des Donors

Q_a = Quantenausbeute des Akzeptors

Die Quantenausbeute beschreibt das Verhältnis aus der Anzahl der absorbierten Photonen und der tatsächlich resultierten Fluoreszenz. Sie ist meist kleiner als 1 und beträgt für den Donor CFP 0,4 und für den Akzeptor YFP 0,61.

3.3.10.2 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer eines Proteins beschreibt die Zeit, in der ein Fluoreszenzprotein Strahlung emittiert, nachdem es angeregt wurde und bevor es wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Die Messung der Lebensdauer wird als FLIM (*fluorescence lifetime imaging*) bezeichnet. Die Dauer dieser Lebenszeit kann dadurch bestimmt werden, dass zu verschiedenen Zeitpunkten die Fluoreszenzintensität bestimmt wird (s. Abbildung 3.8).

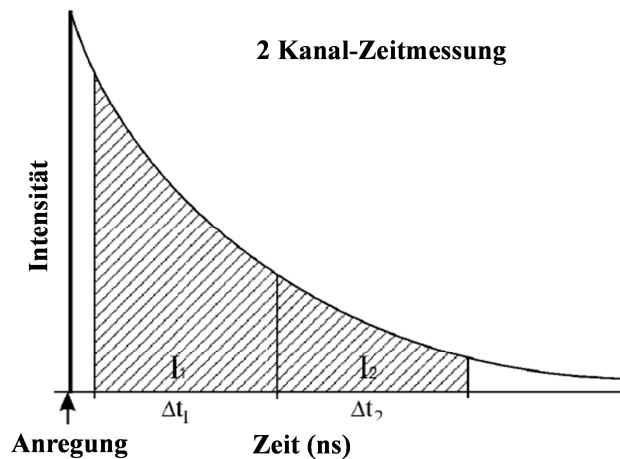


Abbildung 3.8: Messung der Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Anregung eines Fluoreszenzproteins am Beispiel einer 2-Kanalmessung (Gerritsen et al., 2002)

Die Intensitäten können durch eine Mono-Exponentielle Funktion angeglichen werden. Wie bereits in Kapitel 3.3.10 erwähnt, verkürzt sich die Lebenszeit des Donors, sobald ein Energietransfer auf einen Akzeptor stattfindet. Vergleicht man nun die Lebenszeiten

einer reinen Donorprobe mit den gemessenen Proben, die den Donor und Akzeptor enthalten, kann die FRET-Effizienz mit folgender Formel bestimmt werden (Wallrabe and Periasamy, 2005):

$$E = 1 - (\tau_{DA} \div \tau_D) \quad 3.11$$

τ_{DA} = mittlere Fluoreszenzlebenszeit des angeregten Donors in Anwesenheit eines Akzeptors

τ_D = mittlere Fluoreszenzlebenszeit des angeregten Donors alleine

Der Vorteil von FLIM ist, dass die Messung intensitätsunabhängig ist (Oida et al., 1993).

HEK293-Zellen wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (s. Kapitel 3.3.8) unter Verwendung eines 40 x Ölimmersions-Objektivs (Plan Fluor 40x oil; NA 1,4, Nikon) bei 37 °C betrachtet. Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den HO-Isoenzymen und der CPR wurden die HEK293-Zellen mit HO-1, HO-1ΔC266, HO-2 oder HO-2ΔC289 zusammen mit CPR (jeweils gegensätzlich mit CFP oder YFP markiert) kotransfiziert. Zur Berechnung der FRET-Effizienz musste zusätzlich die Lebenszeit einer reinen Donorprobe bestimmt werden. Hierzu wurden die Zellen mit CFP-HO-1 alleine transfiziert. Die Oligomerisierung der HO-Formen wurde untersucht, indem HEK293-Zellen kotransfiziert wurden mit den jeweiligen Fluoreszenzpaaren CFP-HO und YFP-HO für HO-1, HO-1ΔC266, HO-2 und HO-2ΔC289. Zur Bestimmung der Lebenszeit der reinen Donorprobe wurden die jeweiligen CFP-HO-DNAs alleine verwendet. Die transfizierten Zellen wurden mit einem gepulsten Laser bei 405 nm angeregt. Die Detektion erfolgte mit dem 4-Kanal-Zeitpunkts-Detektions-System der Fa. Nikon (LiMo module) unter Verwendung eines CFP-Breitbandfilters (475/20 nm). Die Messung in vier Kanälen erhöhte hierbei die Detektionsgenauigkeit.

3.3.11 Zytotoxizitätstest

Die Zellviabilität kann mit Hilfe des gelben Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) untersucht werden, welches hauptsächlich durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH aus der Zelle in blau-violettes Formazan umgewandelt wird (Berridge and Tan, 1993). Die Menge des gebildeten Formazans ist abhängig von der Zellatmung, welche umso höher ist, je viabler die Zellen sind. Das gebildete Formazan kann im Anschluss photometrisch vermessen werden. Die Durchführung orientiert sich an den Beschreibungen von Lindl and Bauer, 1994. HEK293-Zellen wurden in einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 96-well Platte ausgesät und für mehrere Stunden anwachsen lassen. Anschließend erfolgte die Transfektion wie in Kapitel 3.3.2.2 beschrieben und eine 48-stündige Inkubation. Untersucht wurden GFP-HO-1, GFP-HO-1ΔC266, GFP-HO-2 und GFP-HO-2ΔC289 für den Translokationsversuch unter Hypoxie und GFP-HO-1, GFP-HO-2

und GFP-HO-2C265S/C282S für den Translokationsversuch mit Hämin. Pro Konstrukt wurden mindestens drei Vertiefungen transfiziert. Anschließend wurde entweder 100 μ M Hämin in DMSO zugegeben oder die Platte in den Hypoxie-Brutschrank gestellt und analog den Translokationsversuche 42 h inkubiert. Im Anschluss wurde in jede Vertiefung 20 μ l MTT-Lösung zugegeben, die Platte vorsichtig gemischt und 2 h bei 37 °C im CO₂ Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden 100 μ l Lysislösung zugeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte im Mikropplattenleser Sunrise™ der Fa. TECAN® (Männedorf, Schweiz) 5 min geschüttelt, bevor die Extinktionsmessung bei 550 nm erfolgte. Untransfizierte HEK293-Zellen dienten als Referenz (Viabilität 100 %).

3.3.12 Bestimmung des Redoxstatus

Der Einfluss von NOsGC oder der CPF-Mutante α_1 C15S/ β_1 auf den Redoxstatus einer Zelle wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzprotein-basierten Redoxsensors untersucht. Verwendet wurde hierfür Grx1-roGFP2. Der eigentliche Redoxsensor ist hierbei roGFP2, welcher auf eGFP basiert. Er macht sich die Eigenschaft zu Nutze, abhängig vom Redox-Zustand mit unterschiedlichen Fluoreszenzwellenlängen angeregt werden zu können. Im oxidierten Zustand befindet sich das Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 405 nm, im reduzierten Zustand bei 488 nm. Die Emission wird jeweils im Bereich von 500-550 nm gemessen. Bildet man nun den Quotienten aus den Fluoreszenzintensitäten der Anregung bei 405 nm und der bei 488 nm, kann eine Aussage über den Redox-Zustand getroffen werden (Hanson et al., 2004). Durch die Fusionierung von Glutaredoxin-1 (Grx1) an roGFP2 wird sowohl die Empfindlichkeit als auch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht (Gutscher et al., 2008). Für die Untersuchungen wurden die α_1 -Untereinheiten carboxy-terminal mit dem Redoxsensor Grx1-roGFP2 fusioniert und die CPF-Mutation eingeführt (s. Kapitel 3.2.2.6). Diese Konstrukte wurden jeweils entweder alleine oder zusammen mit der β_1 -Untereinheit in HEK-293 Zellen exprimiert (s. Kapitel 3.3.2.2) und mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei den o.g. Wellenlängen untersucht. Das Verhältnis der Strahlungsintensitäten der beiden verschiedenen Anregungswellenlängen wurde optisch durch die Färbung der Zellen dargestellt.

3.3.13 Statistische Auswertung

Wenn nicht anders angegeben, sind alle Messwerte Mittelwerte unter Angabe des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student-t-Tests berechnet und ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Die HO

Die HOs werden für *in vitro* Untersuchungen von verschiedenen Arbeitsgruppen durch die Expression in *E.coli*-Bakterien gewonnen. Posttranslationelle Modifikationen können in prokaryotischen Systemen allerdings nicht stattfinden. Die von unserer Arbeitsgruppe erstmalig durchgeführte Expression im Sf9-Zellsystem bietet den Vorteil, dass durch Methylierungen und Glykosylierungen die rekombinant hergestellten Enzyme mit den humanen Enzymen weitestgehend übereinstimmen. Ein weiterer Vorteil des Sf9-Systems ist die Expressionsmöglichkeit für größere Enzyme, wie z.B. die Cytochrom-P450-Oxidoreduktase mit einer Größe von 77 kDa (Tamura et al., 1992). Die zusätzliche Expression der Biliverdinreduktase in Sf9-Zellen ermöglichte es, ein flexibles Untersuchungssystem zu etablieren, bei dem auch Einzelkomponenten variiert oder weggelassen werden konnten. Bisher wurde in vielen Arbeitsgruppen für Enzymaktivitätsuntersuchungen aufbereitetes Lebercytosol eingesetzt, welches die benötigte Biliverdinreduktase und die Cytochrom-P450-Oxidoreduktase gleichermaßen enthielt. Die Expression im Sf9-System bietet somit eine gute Grundlage für genauere Untersuchungen zwischen den HOs und der CPR, eine für die Enzymaktivität entscheidende Komponente.

4.1.1 Untersuchungen der CPR-Abhängigkeit

4.1.1.1 Enzymaktivität in Cytosol und Homogenisat

Die Enzymaktivitätsuntersuchungen wurden zunächst nach der cytosolischen Aufbereitung der Proben durchgeführt (s. Kapitel 3.3.6.1). Die Messungen erfolgten in An- und Abwesenheit von exogen zugegebener CPR. Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Isoenzymen festgestellt werden. Die HO-1 zeigte nur in Anwesenheit exogener CPR ihre volle spezifische Aktivität, ohne CPR war die Aktivität um mehr als das 20-fache reduziert (Abbildung 4.1-A). Bei der HO-2 hingegen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivitäten in An- und Abwesenheit exogener CPR festgestellt werden (Abbildung 4.1-A). Erfolgt die gleichen Aktivitätsbestimmungen im Homogenisat der HO-Proben (Abbildung 4.1-B), so konnte kein Unterschied zwischen den beiden Isoenzymen festgestellt werden. Beide zeigten katalytische Aktivität ohne exogen hinzugegebener CPR. Dies deutet darauf hin, dass beide Isoenzyme mit einer in Sf9-Zellen endogen vorkommender CPR interagieren können. Diese Fähigkeit scheint durch die Aufbereitung des Cytosols für die HO-1 im Gegensatz zur HO-2 verloren gegangen zu sein.

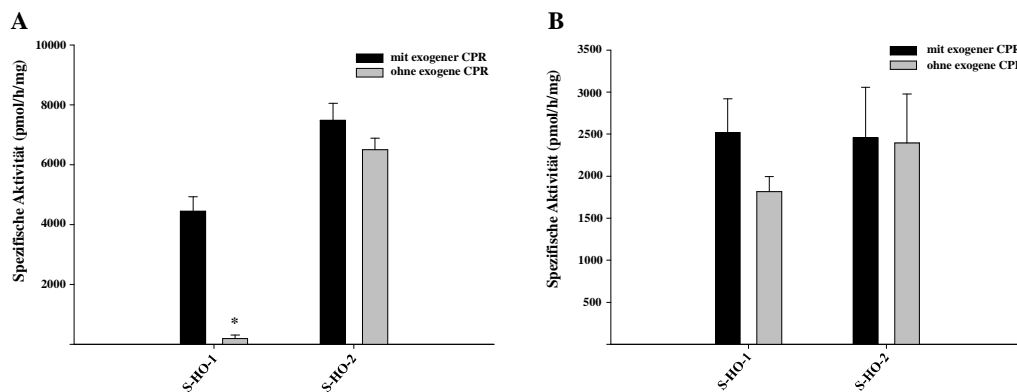


Abbildung 4.1: Aktivitätsbestimmung von HO-1 und HO-2. Untersuchungen der spezifischen Aktivität im Cytosol (A) im Vergleich zum Homogenisat (B). Die schwarzen Balken repräsentieren die Aktivitäten in Anwesenheit von exogener CPR, die grauen Balken die in Abwesenheit. Die Messwerte stellen Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM dar. Die Abhängigkeit der HO-1 von CPR im Cytosol ist statistisch signifikant (* $p < 0,05$). Das S steht für die *Strep*-tag®II-verknüpfte Form.

Die Instabilität von exprimierten HO-Formen in *E.coli* ist bekannt (Ishikawa et al., 1991). Dies führt zu Verkürzungen im carboxy-terminalen Bereich der HO. Dieser Bereich ist für die Membranverankerung im ER essentiell. Diese Instabilität könnte der Grund sein, weshalb die Fähigkeit der HO-1 zur Interaktion mit der CPR während der Cytosol-Aufbereitung verloren gegangen ist. Sollten diese Überlegungen zutreffend sein, so müssten Mutanten, die in dem carboxy-terminalen Bereich verkürzt sind, primär nicht in der Lage sein mit endogener CPR interagieren zu können. Hierfür wurden carboxy-terminal verkürzte HO-Formen exprimiert (HO-1 Δ C266 und HO-2 Δ C289). Untersuchungen in Cytosol und Homogenisat bestätigten diese Überlegung. So wurde für beide Isoenzyme ein signifikanter Unterschied in der katalytischen Aktivität in An- und Abwesenheit exogener CPR festgestellt (Abbildung 4.2).

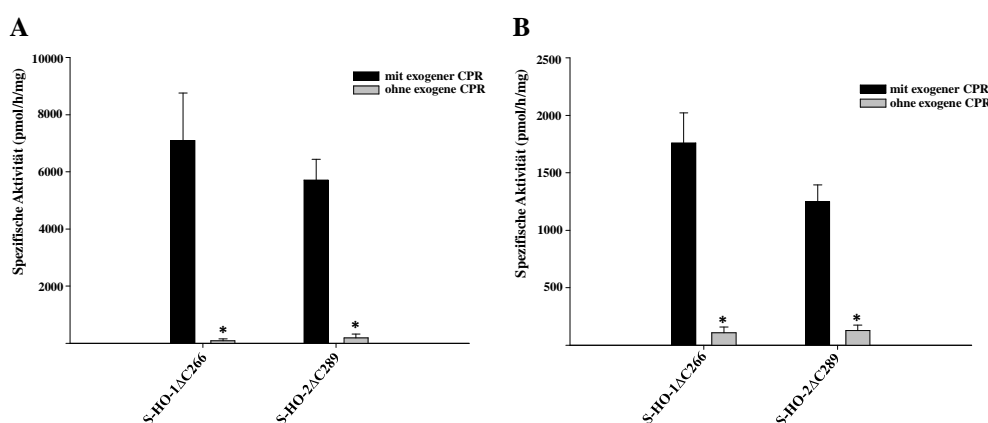


Abbildung 4.2: Aktivitätsbestimmung der Mutanten von HO-1 und HO-2. In Cytosol (A) und Homogenisat (B) bestand eine Abhängigkeit der carboxy-terminal verkürzten Mutanten von exogener CPR (schwarze Balken), während die spezifische Aktivität ohne exogene CPR (graue Balken) kaum nachweisbar war. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM. Die Abhängigkeit ist statistisch signifikant (* $p < 0,05$).

4.1.1.2 Enzymaktivität nach der Anreinigung

Die Verknüpfung der HO-Formen mit einem *Strep*-tag® II im amino-terminalen Bereich der Enzyme (S-HO) führte dazu, dass die Enzyme angereinigt werden konnten. Abbildung 4.3 zeigt das Ergebnis der Aktivitätsbestimmungen nach der Anreinigung der HO-Isoenzyme 1 und 2 und deren jeweiligen verkürzten Mutanten. Alle Formen waren nach der Anreinigung noch katalytisch aktiv. Es zeigte sich, dass alle angereinigten Enzyme nun abhängig von exogen zugegebener CPR waren. Diese Abhängigkeit war in allen Fällen signifikant. Die nun aufgetretene Abhängigkeit der HO-2 von CPR könnte darauf zurückzuführen sein, dass die endogene CPR nicht mitangereinigt wurde.

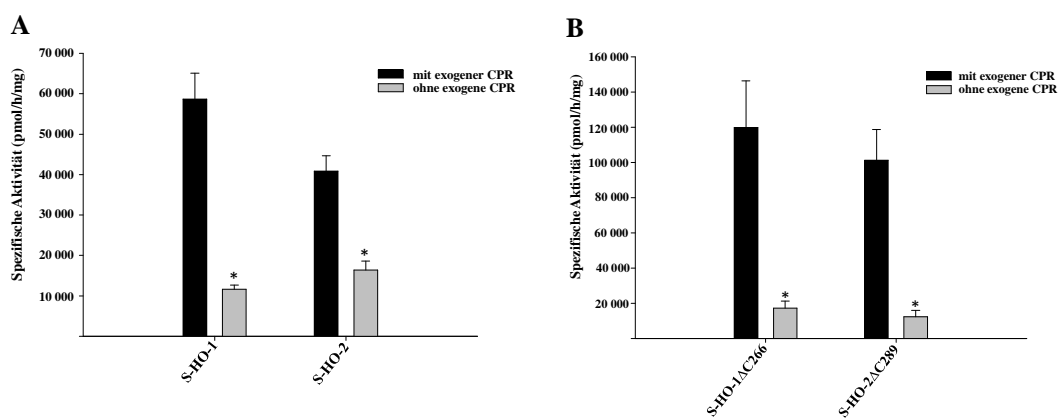


Abbildung 4.3: Aktivitätsbestimmungen nach der Anreinigung der HOs. Eingesetzt wurden 25 µg angereinigtes Protein von den HO-Isoenzymen und von den carboxy-terminal verkürzten Mutanten. Die Untersuchungen wurden in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit von exogener CPR (graue Balken) durchgeführt. Sowohl die Wildtypen (A) als auch die carboxy-terminal verkürzten Mutanten (B) zeigen eine signifikante CPR-Abhängigkeit (*p < 0,05). Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte aus drei Versuchen ± SEM.

4.1.1.3 CPR-Konzentrationsabhängigkeit von angereinigter HO

Die Abhängigkeit der HO-Isoenzyme von exogen zugegebener CPR nach der Anreinigung wurde durch die Messung von CPR-Konzentrationsabhängigkeitskurven näher untersucht. Hierfür wurden den angereinigten HO-Enzymen verschiedene Mengen an cytosolisch aufbereiteter CPR angeboten und die Enzymaktivität gemessen. Die Menge an CPR rangierte zwischen 1/20 und der 5-fachen Menge der CPR-Standardmenge (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5). Nach der Bestimmung der spezifischen Aktivitäten wurden für die verschiedenen HO-Formen die CPR-Mengen bestimmt, bei denen die Aktivitäten halbmaximal waren (vergleichbar zu EC₅₀ Werten). Diese sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

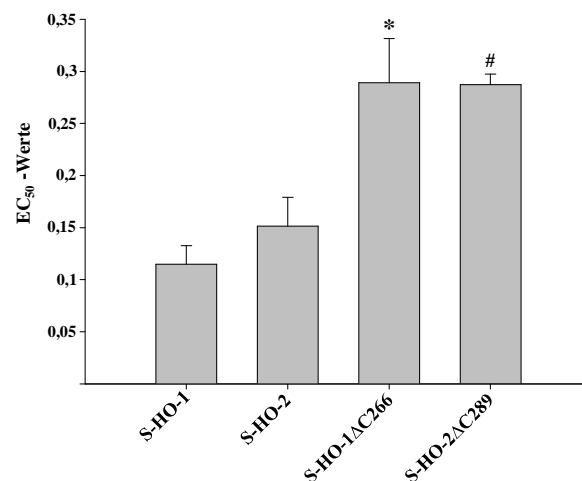


Abbildung 4.4: Einfluss verschiedener CPR-Konzentrationen auf die HO-Enzymaktivität. Die Darstellung erfolgt mit Hilfe des EC₅₀-Wertes. Die CPR wurde in den Konzentrationen: 0; 1/20; 1/10; 1/5; 1/2; 1; 2; 5 bezogen auf die Standardmenge (vgl. Kapitel 3.3.6.1) eingesetzt. Die Berechnung erfolgte nach drei unabhängigen Versuchen. Die Unterschiede zwischen HO-1 und HO-1ΔC266 (*) und HO-2 und HO-2ΔC289 (#) sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Das Ergebnis zeigt, dass bei den verkürzten HO-Mutanten die CPR-Konzentration, bei der die spezifische Aktivität halbmaximal war, höher ist, als die bei den Wildtyp-Formen HO-1 und HO-2 (0,29-fache der Standardmenge CPR im Vergleich zu 0,11 bei HO-1 und 0,15 bei HO-2). Diese Unterschiede sind statistisch signifikant ($p < 0,05$). Ein signifikanter Unterschied zwischen HO-1ΔC266 und HO-2ΔC289 konnte hierbei nicht festgestellt werden. Der EC₅₀-Wert von HO-1 war leicht erniedrigt im Vergleich zu dem der HO-2, aber auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied. Die CPR-Interaktion scheint für diese beiden Formen also vergleichbar zu sein. Dies entspricht auch den Aktivitätsergebnissen nach der Anreinigung.

4.1.2 Koexpression von HO und CPR

Um die Interaktion zwischen den HO-Formen und der CPR genauer untersuchen zu können, wurden Koexpressionsversuche der beiden Enzyme durchgeführt. Hierfür wurden Sf9-Zellen sowohl mit den Viren, codierend für die HO-Formen als auch mit dem Virus, codierend für die CPR, koinfiziert. In der Literatur ist beschrieben, dass es Bindestellen für die CPR an der HO-1 gibt (Wang and de Montellano, 2003 und Higashimoto et al., 2008). Für die HO-2 gibt es hierzu bisher keine Veröffentlichungen. Bei Vergleich der Aminosäuresequenzen von HO-1 und HO-2 ist allerdings erkennbar, dass die für die Bindung wichtigen Aminosäuren bei beiden Isoenzyme zu 77,8 % übereinstimmen und die restlichen Aminosäuren zumindest stark konserviert sind (s. Abbildung 1.1). Ziel der Untersuchung war nun die Klärung der Frage, ob bei einer gleichzeitigen Überexpression, die Interaktion zwischen HO und CPR so stark ist, dass eine gemeinsame Anreinigung möglich ist. Die Anreinigung erfolgte mit Hilfe der

Affinitätschromatografie über einen *Strep*-tag[®]II, der an den Amino-Terminus der HO-Formen fusioniert war (vgl. Kapitel 3.3.4.1).

4.1.2.1 SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse der Anreinigungen

Für die Untersuchungen wurden sowohl HO-1 und HO-2 als auch die verkürzten Formen HO-1 Δ C266 und HO-2 Δ C289 eingesetzt. Nach der gemeinsamen Anreinigung mit der CPR wurde eine SDS-PAGE-Analyse durchgeführt. Hiernach wurde eine Coomassie-Färbung und zur genaueren Charakterisierung der Banden zusätzlich eine Western-Blot-Analyse mit den entsprechenden HO- und CPR-Antikörpern durchgeführt (Abbildung 4.5). Untersucht wurde jeweils das Cytosol (C) vor der Anreinigung und 5 μ g der angereinigten Probe (A). HO-1 zeigt in Abbildung 4.5-A zwei Banden in Höhe von ca. 30 kDa, welche durch den HO-1 Antikörper detektiert werden konnten. Eine ähnliche Bandenanordnung zeigt sich auch bei HO-1 Δ C266 (Abbildung 4.5-C). Die oberen Banden unterscheiden sich jeweils in ihrem Molekulargewicht, was durch einen direkten Vergleich der Proben untersucht wurde (Abbildung 4.6-A). Diese entsprachen den eigentlichen Translationsprodukten von HO-1 und HO-1 Δ C266. Die unteren Banden in Abbildung 4.5-A und C stellen ein Abbauprodukt dar, vergleichbar mit dem von Yoshida et al beschrieben, welches 28 kDa groß ist (Yoshida et al., 1991).

Für HO-2 und HO-2 Δ C289 ist im Bereich von 34 kDa jeweils nur eine Bande sichtbar, welche auch mit dem HO-2-Antikörper detektiert werden konnte (Abbildung 4.5-B und D). Auch hier konnte im direkten Vergleich bewiesen werden, dass diese Banden sich in ihrer Größe unterschieden entsprechend den jeweiligen Translationsprodukten von 38 kDa für S-HO-2 und 35 kDa für S-HO-2 Δ C289 (Abbildung 4.6-B).

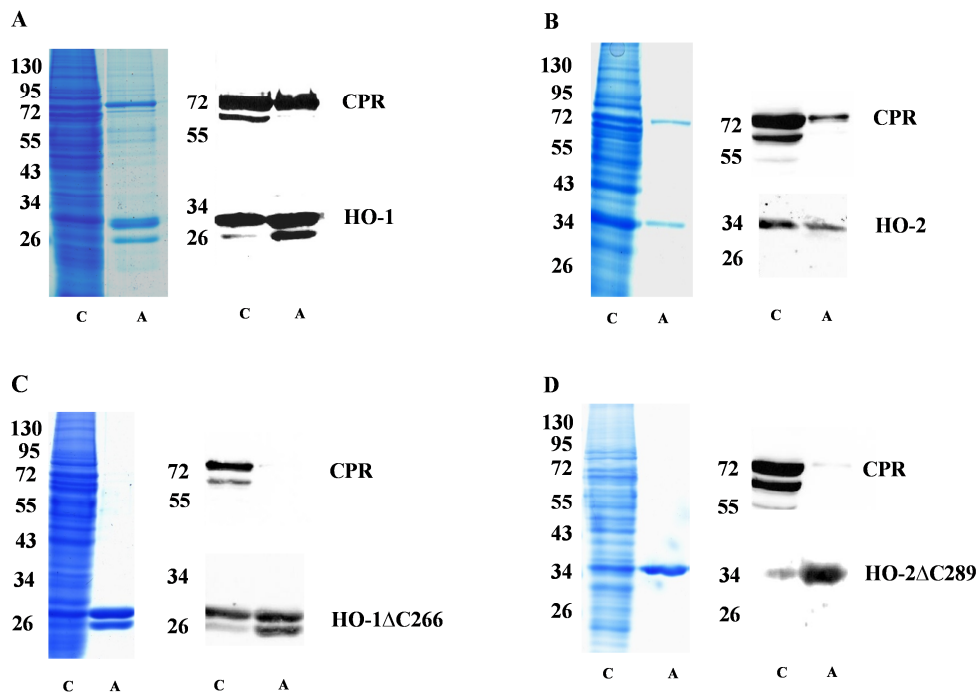


Abbildung 4.5: SDS-PAGE der Koanreinigungen von HO und CPR. Abgebildet sind die Coomassie-Färbung und die Immunodetektion nach Western-Blot für die Koanreinigungen von S-HO-1 (A), S-HO-2 (B), S-HO-1 Δ C266 (C) und S-HO-2 Δ C289 (D) jeweils mit CPR. Aufgetragen wurden 80 μ g des Cytosols (C) vor der Anreinigung und 5 μ g der Anreinigung (A). Die Immunodetektion erfolgte mit einem CPR-Antikörper und den entsprechenden HO-1 oder HO-2-Antikörpern. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

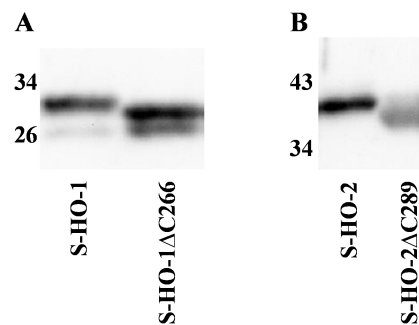


Abbildung 4.6: Western-Detektion der HO-Isoenzyme und der Deletionsmutanten. Verwendet wurden der HO-1-Antikörper (Abbildung A) oder der HO-2-Antikörper (Abbildung B). Die Banden der Wildtypen laufen höher als die der Deletionsmutanten. (A) HO-1 und HO-1 Δ C266 zeigen jeweils eine zweite Bande, die gleich groß ist. (B) Bei HO-2 ist jeweils nur eine Bande sichtbar. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

Ein entscheidender Unterschied, der beim Betrachten der Coomassie-Färbung in Abbildung 4.5, auffällt, ist, dass bei den Wildtyp Formen HO-1 und HO-2 nach den Anreinigungen eine deutliche, zusätzliche Bande bei etwas über 72 kDa vorhanden ist. Diese entsprechen der Größe der CPR mit 77 kDa und konnten bei der Western-Blot-Analyse mit dem CPR-Antikörper detektiert werden. Bei den angereinigten Proben der Deletionsmutanten, koinfiziert mit CPR, sind zwar ebenfalls hauchdünne Banden

erkennbar, es zeigte sich aber, dass diese nicht quantitativ mit CPR interagieren konnten. Dies ist eine Bestätigung dafür, dass der carboxy-terminale Membrananker essentiell für die Interaktion zwischen der HO und der CPR ist.

4.1.2.2 Enzymaktivität der HO-CPR-Koinfektionen

Nach der Bestätigung durch die SDS-PAGE, dass eine gemeinsame Anreinigung von Wildtyp HO und CPR möglich ist, sollte nun untersucht werden, ob dies auch einen Einfluss auf die Enzymaktivitäten der Proben hat. Zuerst wurden die Cytosole der koinfizierten Sf9-Zellen mit Wildtyp HO-1 oder HO-2 plus CPR vor der Anreinigung untersucht. Durch die koexprimierte CPR konnte bei beiden HO-Formen bereits eine maximale Enzymaktivität erreicht werden ohne die Zugabe von exogener CPR (Abbildung 4.7-A). Nach der Anreinigung zeigte sich ein entsprechendes Ergebnis: Auch hier hatte exogen zugegebene CPR keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der Enzymaktivität (Abbildung 4.2-B). Dies stellt einen eindeutigen Unterschied zu den Anreinigungen ohne CPR dar (vgl. auch Abbildung 4.3) und bestätigt, dass eine gemeinsame Anreinigung von HO und CPR stattgefunden haben muss.

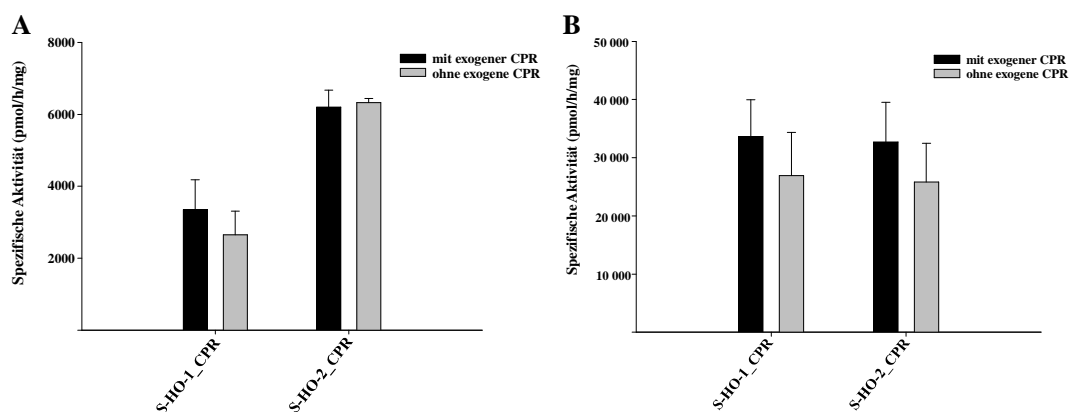


Abbildung 4.7: Aktivitätsbestimmungen der HO-CPR-Koinfektionen. Die Aktivitäten wurden im Cytosol (A) und nach der Anreinigung bestimmt (B). Eingesetzt wurden 25 µg angereinigtes Protein. Die Untersuchungen wurden in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit von exogener CPR (graue Balken) durchgeführt. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte aus drei Versuchen ± SEM.

Die cytosolischen Untersuchungen der carboxy-terminal verkürzten HO-Formen, koexprimiert mit CPR, zeigten ein vergleichbares Ergebnis zu den Wildtyp Formen. Durch die bereits vorhandene CPR wurde eine maximale Enzymaktivität erreicht, die durch Zugabe exogener CPR nicht mehr verändert wurde (Abbildung 4.8-A). Nach der Anreinigung konnte eine Zugabe von exogener CPR die Enzymaktivität allerdings um das mehr als 5-fache steigern. Diese Aktivitätsunterschiede waren statistisch signifikant und sprechen dafür, dass nur ein kleiner Anteil an koexprimierter CPR mit angereinigt wurde (Abbildung 4.8-B).

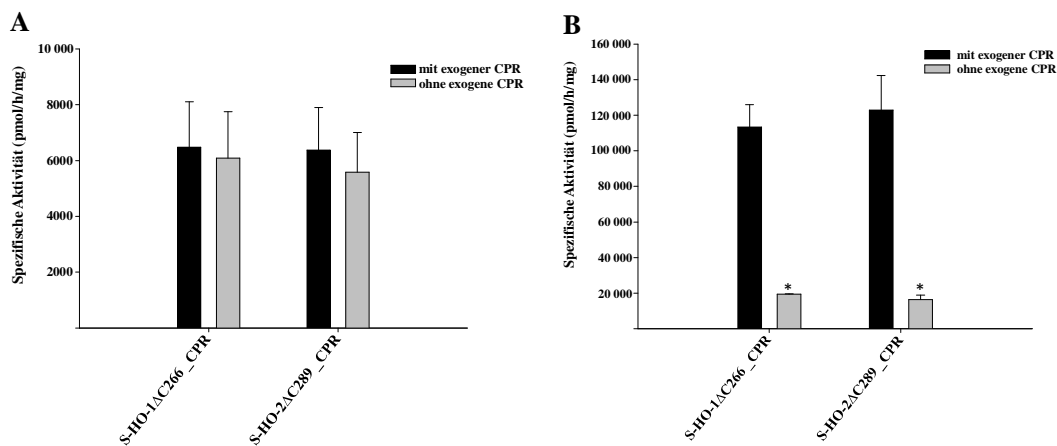


Abbildung 4.8: Aktivitätsbestimmungen der verkürzten HO-CPR-Koinfektionen. Die Aktivitäten wurden im Cytosol (A) und nach der Anreinigung bestimmt (B). Eingesetzt wurden 25 µg angereinigtes Protein. Die Untersuchungen wurden in Anwesenheit (schwarze Balken) und Abwesenheit von exogener CPR (graue Balken) durchgeführt. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte aus drei Versuchen ± SEM. * zeigt eine statistisch signifikante Abhängigkeit von exogener CPR (* $p < 0,05$).

4.1.2.3 Einfluss von CPR auf die HO-Oligomerisierung

Eine nach der Anreinigung durchgeführte Gelfiltration zur Größenbestimmung zeigte für die carboxy-terminal verkürzten Mutanten HO-1ΔC266 und HO-2ΔC289 ein einzelnes Maximum bei einem Elutionsvolumen entsprechend der Größe von ca. 40 kDa (Abbildung 4.9-A und B). Dies spricht für ein monomeres Vorliegen der beiden Enzyme. Die Untersuchung von HO-1 und HO-2 ergab eine Elutionskurve mit jeweils zwei Maxima (Abbildung 4.9-C und D), eines entsprechend der Größe von ca. 40 kDa (Maximum 2), das andere entsprechend einer Größe von größer 2000 kDa (Maximum 1). Dies deutet auf eine Oligomerbildung der Proteine hin. Die Elutionsvolumina stimmten zwar bei beiden HO-Formen überein, das Verhältnis beider Maxima zueinander unterschied sich allerdings für HO-1 und HO-2. Vergleicht man die Flächen unterhalb der Kurve (AUC) der beiden Elutionsmaxima von HO-1, so ist die AUC von Maximum 2 dreimal so groß wie die von Maximum 1. Bei der HO-2 verhält es sich divergent, hier ist die AUC von Maximum 1 mehr als doppelt so groß wie die von Maximum 2. Die HO-2 scheint also zu einem höheren Anteil oligomer vorzuliegen. Die Fraktionen der verschiedenen Maxima wurden gesammelt, aufkonzentriert und anschließend durch eine SDS-PAGE analysiert. Die durchgeführte Western-Blot-Analyse mit den entsprechenden HO-Antikörpern, bestätigte das vermutete Ergebnis der Gelfiltration (Abbildung 4.9-kleine Kästchen). Durch Vergleich der Bandenintensitäten konnte bestätigt werden, dass die HO-1 vermehrt in Maximum 2 vorlag, wo auch das 28 kDa große Abbauprodukt zu finden war. Die Detektion der HO-2 bestätigte ihr Vorliegen fast vollständig in den Fraktionen des ersten Maximums.

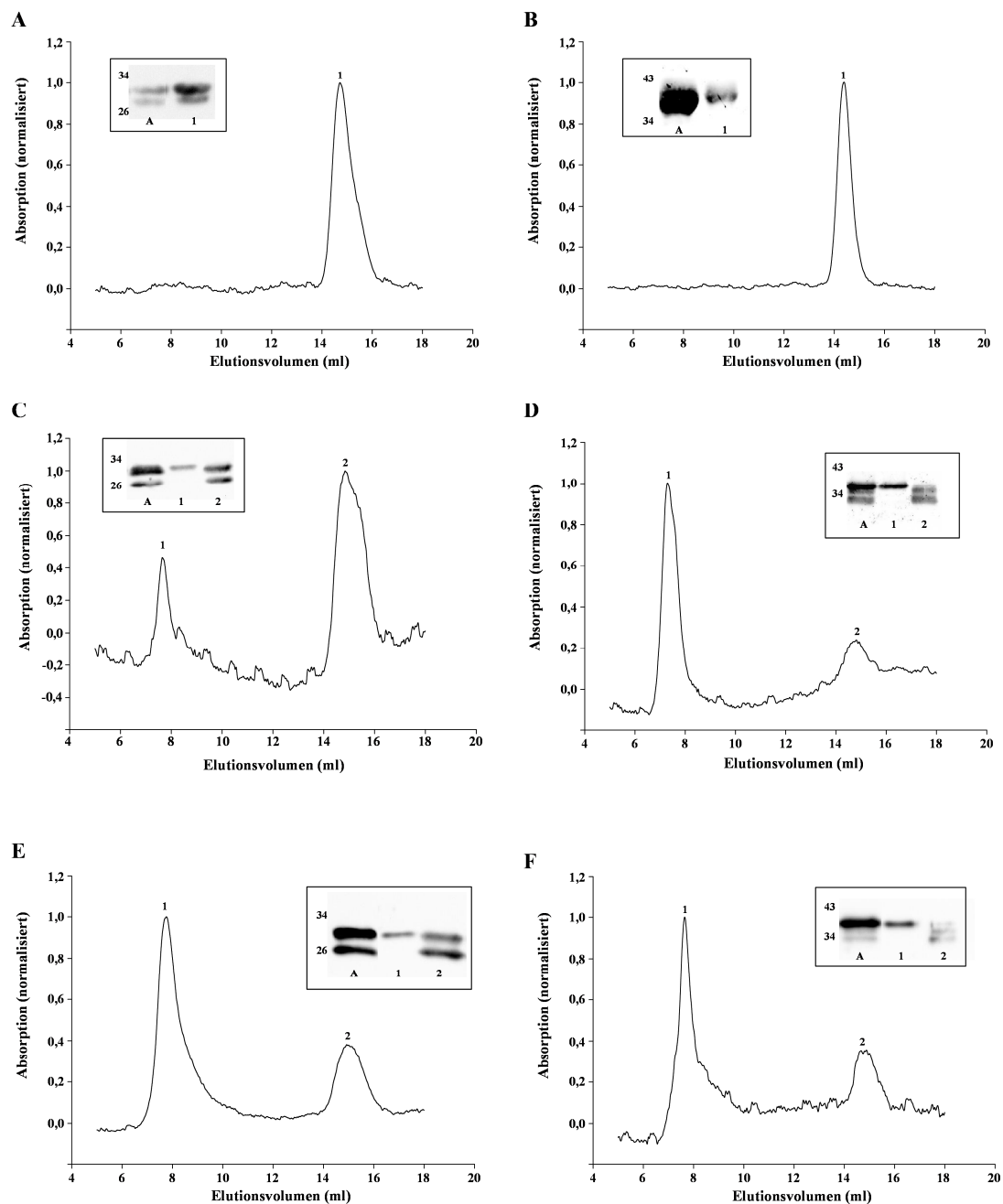


Abbildung 4.9: Gelfiltrationen der HOs und den Koinfektionen mit CPR. (A) S-HO-1ΔC266 (B) S-HO-2ΔC289 (C) S-HO-1 (D) S-HO-2 (E) S-HO-1-CPR-Koanreinigung (F) S-HO-2-CPR-Koanreinigung. Es wurden jeweils 150 µg angereinigtes Protein eingesetzt. Das Elutionsvolumen der ersten Maxima entspricht dem ungefähren Totvolumen der Säule, was auf Aggregate > 2000 kDa schließen lässt. Die zweiten Peaks entsprechen vom Elutionsvolumen her ungefähr einer Größe von 40 kDa. Die Absorptionen wurden auf den höchsten Absorptionswert normiert. In den Boxen ist die Western-Blot Analyse der eingesetzten Anreinigungen (A) und der Fraktionen der jeweiligen Elutionsmaxima zu sehen. Die Detektion erfolgte mit den entsprechenden HO-Antikörpern.

Die Koanreinigung der HO-2 mit der CPR hatte keinen Einfluss auf das oligomere Vorliegen der HO-2, sowohl das Verhältnis der Maxima in der Gelfiltration als auch die Bandenintensitäten bei der Western-Blot-Analyse blieben hierbei gleich. Betrachtet man

nun das Verhältnis der AUC bei der Koanreinigung von HO-1 und CPR, so fand eine Verschiebung zugunsten der Fläche von Maximum 1 statt, welche nun mehr als doppelt so groß war wie die von Maximum 2. Die Western-Blot-Analyse zeigte hier eine leichte Verstärkung der Bandenintensität der Fraktionen von Maximum 1, was dafür spricht, dass nun mehr HO-1 als Oligomer vorliegt. Ein gewisser Anteil scheint allerdings auch weiterhin in monomerer und verkürzter Form vorzuliegen. Die carboxy-terminal verkürzten HO-Mutanten wurden wie erwartet durch CPR nicht beeinflusst, da die gemeinsame Anreinigung, wie bereits in den Kapiteln 4.1.2.1 und 4.1.2.2 beschrieben wurde, nicht stattfinden konnte (Spektren nicht gezeigt).

4.1.2.4 FLIM-Untersuchungen zur HO-Oligomerisierung

Die in Kapitel 4.1.2.3 beschriebene unterschiedliche Oligomerisierung der beiden Isoenzyme HO-1 und HO-2 sollte nun mit Hilfe der Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer weiter untersucht werden. Hierfür wurden die HO-Formen amino-terminal entweder mit dem Fluoreszenzprotein CFP oder YFP verknüpft und in HEK293-Zellen exprimiert. Die Fluoreszenzlebensdauer wurde durch Messung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bestimmt. Falls eine Komplexbildung zwischen den HO-Molekülen in der intakten Zelle stattfindet, müssen sich auch CFP und YFP in räumlicher Nähe zu einander befinden. Dadurch würde sich die Fluoreszenz-Lebensdauer von CFP im Vergleich zu Messungen der reinen CFP-Probe verkürzen. (s. hierzu auch Kapitel 3.3.10.2).

Tabelle 4.1 zeigt die FRET-Effizienzen (%), die nach der Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten berechnet wurden. Eine höhere FRET-Effizienz steht für einen geringeren Abstand zwischen CFP und YFP und damit indirekt auch für eine bessere Interaktion der Moleküle.

| | FRET-Effizienz (%) | SEM (%) |
|---|--------------------|---------|
| CFP-HO-1_YFP-HO-1 | 5.18 | 1.33 |
| CFP-HO-2_YFP-HO-2 | 4.12 | 0.18 |
| CFP-HO-1 Δ C266_YFP-HO-1 Δ C266 | 1.94 | 0.13 |
| CFP-HO-2 Δ C289_YFP-HO-2 Δ C289 | 1.62 | 0.21 |

Tabelle 4.1: FRET-Effizienzen berechnet nach den Lebenszeiten der HO-Koinfektionen in HEK293-Zellen. Koinfektionen von CFP und YFP markierten HO-Isoenzyme wurden mit Hilfe von FLIM mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Die jeweiligen CFP-HO-Formen alleine transfiziert dienten als Donorkontrolle. Das Ergebnis stellt die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Die Berechnung der FRET-Effizienzen der beiden carboxy-terminal verkürzten Mutanten HO-1 Δ C266 und HO-2 Δ C289 ergab Werte kleiner zwei Prozent. Daraus lässt

sich schließen, dass sie kaum miteinander interagieren konnten. Dies lässt sich dadurch begründen, dass diesen beiden HO-Formen der Membrananker fehlt, welcher für die Komplexbildung essentiell ist (Hwang et al., 2009). Unter Berücksichtigung des Standardfehlers zeigten HO-1 und HO-2 eine FRET-Effizienz im vergleichbaren Bereich (zwischen 4-5 %). Diese war mehr als doppelt so groß, wie bei den verkürzten Formen. Dies spricht für eine aufgetretene Komplexbildung der beiden Formen am ER der Zelle. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.2.3, die eine stärkere Oligomerisierung der HO-2 zeigen, konnten hierdurch allerdings nicht belegt werden. Eine Erklärung könnte hierbei die Versuchsmethode sein. Zur Berechnung der FRET-Effizienz muss immer die Lebenszeit des Donors CFP ohne Anwesenheit von YFP vermessen werden. In diesem Versuch wurden jeweils die CFP-HO-Formen als Donor vermessen. Hierbei stellte sich heraus, dass die Lebenszeiten von CFP-HO-2 immer kürzer waren als die von CFP-HO-1, so dass die Verkürzung der Lebenszeit für CFP-HO-2 in Anwesenheit von YFP-HO-2 insgesamt nicht mehr so deutlich war als die für HO-1. Dies könnte durch das Auftreten von Homo-FRET innerhalb des CFP-Moleküls zu erklären sein (Grailhe et al., 2006).

4.1.2.5 Untersuchung der HO-CPR-Interaktion durch FRET-Messung

Enzymaktivitätsbestimmungen der HO-Formen zeigten nur für HO-1 einen Unterschied zwischen den cytosolischen Messungen und denen im Homogenisat in Bezug auf die CPR-Abhängigkeit (Kapitel 4.1.1.1). Die zu Grunde liegende Interaktion der HO-Formen mit der CPR sollte nun durch FRET-Messungen genauer untersucht werden. Untersucht wurden Sf9-Cytosole und -Homogenisate, in denen die CFP-verknüpften HO-Formen als Donor vorlagen und die YFP-verknüpfte CPR als Akzeptor. Die nach den Messungen bestimmte FRET-Effizienz ist in Abbildung 4.10 in % \pm SEM dargestellt. YFP-GAFA-CFP diente in diesem Experiment als Positivkontrolle. In diesem Konstrukt sind sowohl CFP als auch YFP kovalent an ein Protein gebunden (Haase et al., 2010c). Im Vergleich der HO-Formen fällt auf, dass nur HO-1 einen signifikanten Unterschied zwischen Cytosol und Homogenisat zeigt. Dies entspricht auch den Ergebnissen aus den Aktivitätsbestimmungen und bestätigt die Vermutung, dass der Verlust des Membranankers für die HO-1 während der Cytosol-Aufbereitung für die verminderte Interaktion mit der CPR verantwortlich ist. Unterstützt wird dies weiterhin dadurch, dass bei den carboxy-terminal verkürzten HO-Mutanten, HO-1 Δ C266 und HO-2 Δ C289, kaum FRET auftrat. Die HO-2 zeigte FRET, der in Cytosol und Homogenisat vergleichbar war. Die Werte waren allerdings niedriger als die für die HO-1.

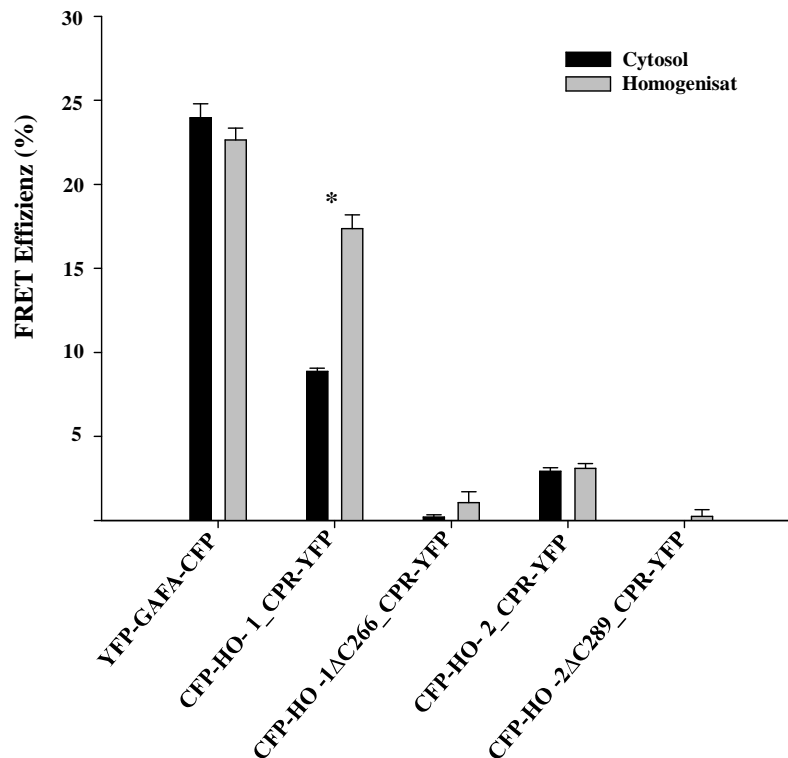


Abbildung 4.10: FRET-Bestimmungen von CFP-HO und CPR-YFP in Sf9-Cytosol (schwarze Balken) und -Homogenisat (graue Balken). Untersucht wurde HO-1, HO-1ΔC266, HO-2 und HO-2ΔC289. Die Berechnung der FRET-Effizienzen (%) erfolgte nach der Formel aus Wallrabe and Periasamy, 2005 (s. Kapitel 3.3.10.1). Die Berechnung erfolgte aus drei unabhängigen Versuchen und ist als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Der Effizienzunterschied zwischen CFP-HO-1_CPR-YFP-Cytosol und Homogenisat ist statistisch signifikant (* $p < 0,05$).

Um auszuschließen, dass die unterschiedlich verwendeten Donoren einen Einfluss auf die FRET-Effizienzen haben, wurde das Experiment etwas modifiziert erneut durchgeführt. Hierfür wurden die Fluoreszenzproteine der HO-Formen und der CPR ausgetauscht, so dass nun die CPR mit CFP verknüpft vorlag und als Donor diente und die HO-Formen YFP verknüpft waren. Diese dienten als Akzeptor. In Abbildung 4.11 sind wiederum die berechneten FRET-Effizienzen des Versuches in % \pm SEM dargestellt. Der Unterschied zwischen den Messungen von CPR-CFP und YFP-HO-1 in Cytosol und Homogenisat war weiterhin vorhanden und ist statistisch signifikant. Die FRET-Effizienzen für die HO-2 waren nun deutlich höher als bei dem Versuch dargestellt in Abbildung 4.10. Ein Unterschied zwischen Cytosol und Homogenisat konnte nicht festgestellt werden. Die carboxy-terminal verkürzten Formen zeigten in Cytosol und Homogenisat vergleichbare Effizienzen, die, wie auch im ersten Experiment, im Vergleich zu HO-1 und HO-2 stark erniedrigt waren.

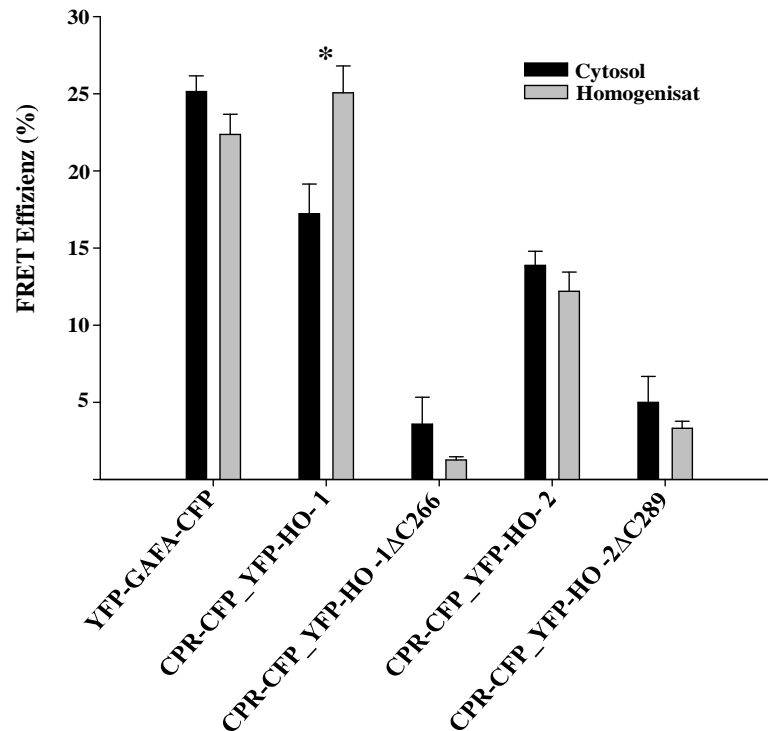


Abbildung 4.11: Bestimmung der FRET Effizienzen von CPR-CFP und YFP-HO in Sf9-Cytosol (schwarze Balken) und -Homogenisat (graue Balken). Die Fluoreszenzproteine wurden im Vergleich zu Abbildung 4.10. ausgetauscht: YFP-GAFA-CFP diente als Positiv-Kontrolle. Die Berechnung erfolgte aus drei unabhängigen Versuchen und ist als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Der Unterschied zwischen Cytosol und Homogenisat bei CPR-CFP_YFP-HO-1 ist statistisch signifikant (* $p < 0,05$).

4.1.2.6 Untersuchung der HO-CPR-Interaktion durch FLIM

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die cytosolische Aufbereitung der HO-Formen einen Einfluss auf die CPR-Interaktion hat. Um genauere Informationen über die HO-CPR-Interaktion direkt in der intakten Zelle zu erhalten, wurde in dem folgenden Experiment die Fluoreszenzlebensdauer (FLIM) in transfizierten HEK293-Zellen bestimmt. Die Durchführung erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Aus den gemessenen Lebenszeiten konnten im Anschluss die FRET-Effizienzen ($\% \pm \text{SEM}$) berechnet werden. Für die Versuche wurden HEK293-Zellen mit DNA codierend für CFP-markierte HO oder YFP-markierte CPR kotransfiziert. Untersucht wurden die Formen HO-1, HO-2, HO-1 Δ C266 und HO-2 Δ C289. Abbildung 4.12 zeigt die Aufnahmen der Zellen im CFP- (jeweils rechtes Foto) und YFP-Kanal (Foto jeweils in der Mitte). Die bestimmte Fluoreszenzlebenszeit ist in Abbildung 4.12 als jeweils rechtes Bild dargestellt (LT). Deutlich zu erkennen ist für HO-1, HO-2 und CPR die Verteilung am ER der Zelle und die cytosolische Verteilung von HO1 Δ C266 und HO-2 Δ C289. Bei dem Vergleich der Färbungen der LT-Bilder mit der Farbskala in der Mitte der Abbildung ist zu erkennen, dass HO-1 und HO-2 eine kürzere Lebenszeit aufweisen als die carboxy-terminal verkürzten Mutanten.

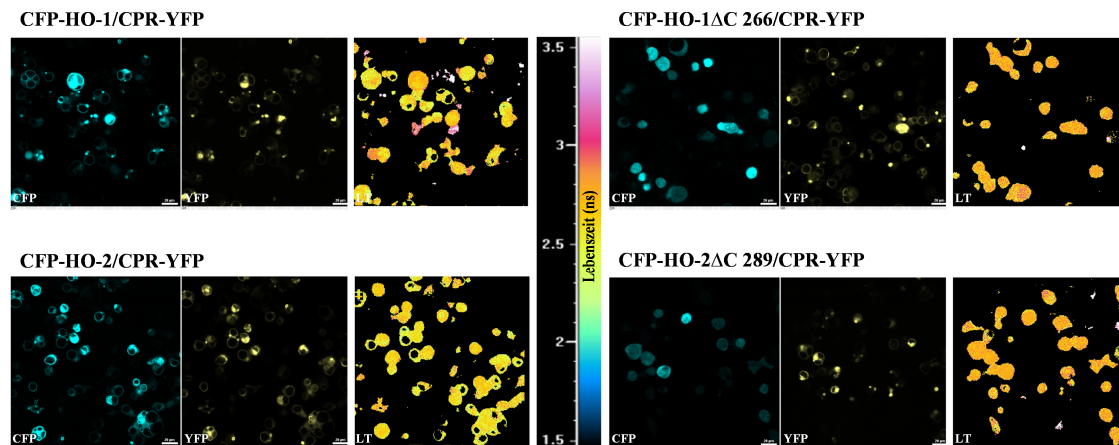


Abbildung 4.12: Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit von CFP-HO und CPR-YFP nach Kotransfektion in HEK293-Zellen mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. CFP: Aufnahmen der HO-Isoenzyme im CFP-Kanal; YFP: Aufnahmen der CPR im YFP-Kanal; LT: Lebenszeit- Bestimmung. Die Färbung der Zellen in der Lebenszeit-Bestimmung entspricht den Lebenszeiten (ns) abgebildet in der Farbskala in der Mitte der Grafik.

Für die Berechnung der FRET-Effizienzen ist die Bestimmung einer reinen Donor-Probe notwendig. Für dieses Experiment wurde CFP-HO-1 alleine in den Zellen exprimiert (Fotos nicht gezeigt) und dessen Lebenszeit bestimmt. Die anschließend kalkulierten FRET-Effizienzen sind in Tabelle 4.2 dargestellt. HO-1 und HO-2 zeigten eine FRET-Effizienz im Bereich von 7-10 %, was für eine Interaktion mit der CPR spricht. Die FRET-Effizienz der carboxy-terminalen Deletionsmutanten waren dagegen vernachlässigbar gering (zwischen 0-1 %), was für eine nicht vorhandene CPR-Interaktion spricht. Der Unterschied zwischen HO-1 bzw. HO-2 und den jeweiligen Deletionsmutanten war statistisch signifikant ($p < 0,05$). Somit konnte auch hier bestätigt werden, dass der Membrananker entscheidend für die HO-CPR-Interaktion ist.

| | FRET-Effizienz (%) | SEM (%) |
|-----------------------|---------------------------|----------------|
| CFP-HO-1_CPR-YFP | 9.98 | 1.71 |
| CFP-HO-2_CPR-YFP | 6.86 | 1.19 |
| CFP-HO-1ΔC266_CPR-YFP | 1.17 | 0.67 |
| CFP-HO-2ΔC289_CPR-YFP | -0.74 | 1.32 |

Tabelle 4.2: FRET-Effizienzen (%) von CFP-HO und CPR-YFP berechnet nach der Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten in HEK293-Zellen (s. Abbildung 4.12). CFP-HO-1 wurde als Donorprobe eingesetzt. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten aus drei Versuchen \pm SEM.

Analog den FRET-Bestimmungen in Kapitel 4.1.2.5 wurden auch bei den FLIM-Bestimmungen ein Austausch der Fluoreszenzproteine vorgenommen. Durch die Verknüpfung der CPR mit CFP konnte dieses Konstrukt bei den Bestimmungen als einheitlicher Donor eingesetzt werden. Als Akzeptor dienten die HO-Formen HO-1,

HO-2, HO-1 Δ C266 und HO-2 Δ C289 verknüpft mit YFP. Die Versuchsdurchführung blieb ansonsten identisch. Die berechneten FRET-Effizienzen sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

| | FRET-Effizienz (%) | SEM (%) |
|--------------------------------|--------------------|---------|
| CPR-CFP_YFP-HO-1 | 3.23 | 0.28 |
| CPR-CFP_YFP-HO-2 | 3.97 | 0.45 |
| CPR-CFP_YFP-HO-1 Δ C266 | 1.11 | 0.33 |
| CPR-CFP_YFP-HO-2 Δ C289 | 2.54 | 0.32 |

Tabelle 4.3: FRET-Effizienzen (%) von CPR-CFP und YFP-HO berechnet nach der Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten in HEK293-Zellen. Die Berechnung erfolgte nach der Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten. CPR-CFP diente als Donorprobe. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten aus drei Versuchen \pm SEM.

Der Austausch der Fluoreszenzproteine führte zu einer Verminderung der FRET-Effizienzen für HO-1 und HO-2 um ca. die Hälfte. Bei HO-1 Δ C266 konnte kein Unterschied festgestellt werden, die FRET-Effizienzen bei HO-2 Δ C289 waren sogar leicht erhöht. Dies führte dazu, dass nur noch die FRET-Effizienz von HO-1 Δ C266 signifikant ($p < 0,05$) kleiner war im Vergleich zu HO-1 und HO-2.

4.1.3 Translokationsversuche unter Hypoxie

Die Verankerung der HO im ER erfolgt über den carboxy-terminalen Teil der HO. Die Publikationen beschränken sich in diesem Zusammenhang nur auf die HO-1 (Yoshida and Sato, 1989 und Hwang et al., 2009), wie auch die Untersuchungen über die Translokation in den Zellkern unter dem Einfluss von oxidativem Stress (Lin et al., 2007). Da sich in den vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeit Hinweise auf Unterschiede zwischen HO-1 und HO-2 in Bezug auf die Stabilität des Membranankers ergeben haben, sollte nun das Verhalten der HO-Formen unter dem Einfluss des Stressfaktors Hypoxie untersucht werden.

4.1.3.1 Einzeltransfektion

Die zelluläre Verteilung der HO wurde mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den entsprechenden HO-Formen, welche amino-terminal mit dem Fluoreszenzprotein GFP gekoppelt waren, transfiziert. Sowohl HO-1 als auch HO-2 zeigten eine deutliche perinukleäre Verteilung in der Zelle (Abbildung 4.13-Zeitpunkt 0 h). Die carboxy-terminalen Deletionsmutanten HO-1 Δ C266 und HO-2 Δ C289 zeigten zu diesem Zeitpunkt eine homogene Verteilung sowohl im Cytosol als auch im Zellkern der Zellen.

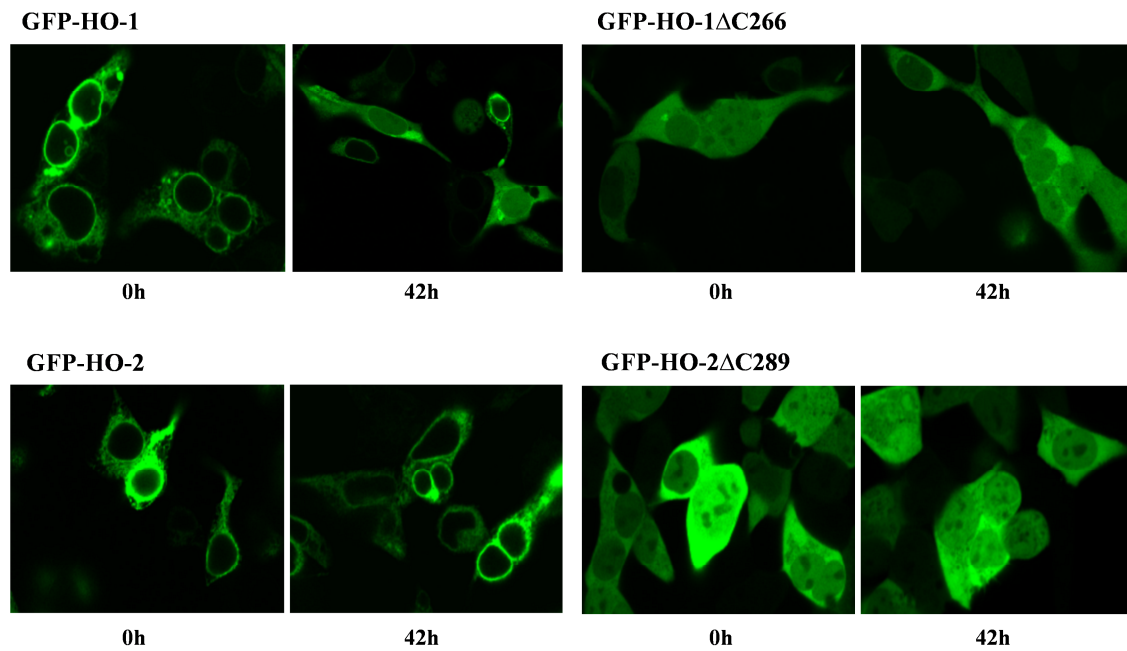


Abbildung 4.13: Translokationsuntersuchungen der HOs nach Hypoxie-Inkubation (1 % Sauerstoff) für 42 h in HEK293-Zellen. Das linke Foto zeigt die Verteilung der HO-Isoenzyme zu Beginn des Versuches und das rechte Foto nach der Inkubation. Die HO-1 zeigt im Unterschied zur HO-2 eine Translokation, die beiden Deletionsmutanten sind von Beginn an homogen in der Zelle verteilt. Die Untersuchungen erfolgten an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

Um die Zellen oxidativem Stress auszusetzen, wurden diese 42 h unter hypoxischen Bedingungen bei einem Sauerstoffgehalt von 1 % im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut unter dem Mikroskop betrachtet (Abbildung 4.13.-Zeitpunkt 42 h). Wie bereits von der Arbeitsgruppe um Phyllis A. Dennerly gezeigt wurde, fand eine Translokation der HO-1 in den Zellkern statt (Lin et al., 2007). Bei 30,1 % der transfizierten Zellen konnte eine nukleäre und cytosolische Verteilung der HO-1 beobachtet werden (Tabelle 4.4). Im Vergleich hierzu waren es bei der HO-2 nur 0,43 % der Zellen. Somit kann die Translokation spezifisch für die HO-1 angesehen werden. Die Deletionsmutanten wurden durch die Inkubation unter Hypoxie nicht beeinflusst. So zeigten fast 100 % der Zellen eine homogene Verteilung in Cytosol und Zellkern wie bereits zu Beginn der Messungen.

| | Zeitpunkt 0h | | nach 42h Hypoxie | |
|--------------------|-------------------|---------|-------------------|---------|
| | Translokation (%) | SEM (%) | Translokation (%) | SEM (%) |
| HO-1 | 1.59 | 1.59 | 30.10 | 3.54 |
| HO-2 | 0 | 0 | 0.43 | 0.43 |
| HO-1 Δ C266 | 100 | 0 | 99.04 | 0.96 |
| HO-2 Δ C289 | 100 | 0 | 100 | 0 |

Tabelle 4.4: Translokationsraten der HO-Isoenzyme in HEK293-Zellen nach 42 h Inkubation unter Hypoxie (1 % Sauerstoff). Bestimmt wurde die Anzahl der Zellen in Bezug zur Gesamtzahl, die eine Verteilung der HO im Zellkern aufweisen zu Beginn des Versuches und nach 42 h. Die Bestimmung erfolgte bei drei unabhängigen Versuchen.

4.1.3.2 Koexpression mit der CPR

Der Oligomerisierungsgrad der HO-1 ist wichtig für die Stabilität der HO-1 (Hwang et al., 2009). Wenn man dies auf die HO-2 überträgt, könnte dies bedeuten, dass die stabilere Verankerung der HO-2 nach der Inkubation unter hypoxischen Bedingungen auf einen höheren Oligomerisierungsgrad in der Zelle zurückzuführen ist (vergleiche hierzu auch Kapitel 4.1.2.3.). Ausgehend von dieser Hypothese sollte untersucht werden, ob die Kotransfektion von CPR, welche zu einem höheren Oligomerisierungsgrad der HO-1 führt (Abbildung 4.9), einen Einfluss auf die Translokation der HO-1 hat.

Für die Untersuchungen wurden HEK 293-Zellen mit HO und CPR kotransfiziert. Zur besseren Unterscheidung lagen die HO-1 und HO-2 jeweils YFP und die CPR CFP verknüpft vor. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 h und nach 42-stündiger Inkubation unter Hypoxie (1 % Sauerstoff) mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet. Zur Kontrolle wurden auch jeweils die HO-Einzeltransfektionen mituntersucht. Wie in Abbildung 4.14 durch die roten Pfeile verdeutlicht wurde, konnte die Translokation von HO-1 (Abbildung A-obere Reihe) durch die Anwesenheit der CPR verhindert werden (Abbildung A-untere Reihe). Die HO-2 blieb durch die Anwesenheit von CPR unbeeinflusst (Abbildung B).

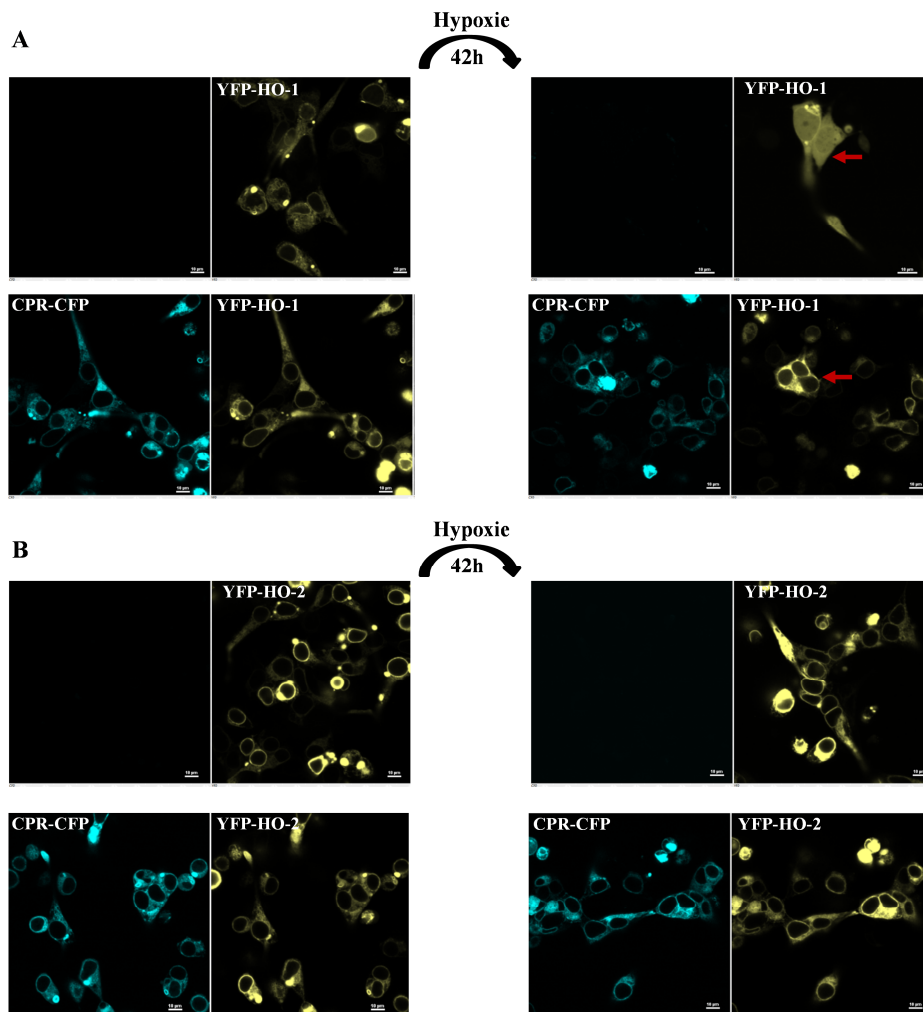


Abbildung 4.14: Einfluss von CPR auf die Translokation von HO unter hypoxischen Bedingungen in HEK293-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Die oberen Reihen zeigen die Einzeltransfektionen von HO-1 (A) und HO-2 (B) im YFP-Kanal und die unteren die Kotransfektionen mit CPR (CFP-Kanal). Nach Inkubation unter Hypoxie (1 % Sauerstoff) für 42 h zeigt nur die HO-1 eine Translokation (A-roter Pfeil in der oberen Reihe), die durch die Kotransfektion mit CPR verhindert wurde (A-roter Pfeil in der unteren Reihe).

4.1.3.3 Koexpression mit der hBVR

Die hBVR ist ein cytosolisches Protein, das die Umsetzung des Reaktionsproduktes der HO, Biliverdin, zu Bilirubin katalysiert. Ähnlich wie die CPR bildet die hBVR mit der HO einen Proteinkomplex in der Zelle (Wang and de Montellano, 2003-Abbildung 1.1). Daher lag die Frage nahe, ob die hBVR analog zur CPR in der Lage ist, die Translokation der HO-1 unter Hypoxie zu verhindern. Analog dem Versuch in Kapitel 4.1.3.2 wurden HEK293-Zellen mit YFP-markierter HO-1 oder HO-2 mit CFP-markierter hBVR (amino-terminal) kotransfiziert. Es wurden Aufnahmen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop im CFP- und YFP-Kanal gemacht (s. Abbildung 4.15 links) bevor die Zellen 42 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden. Im

Anschluss wurden die Zellen erneut mit dem Mikroskop untersucht (s. Abbildung 4.15 rechts).

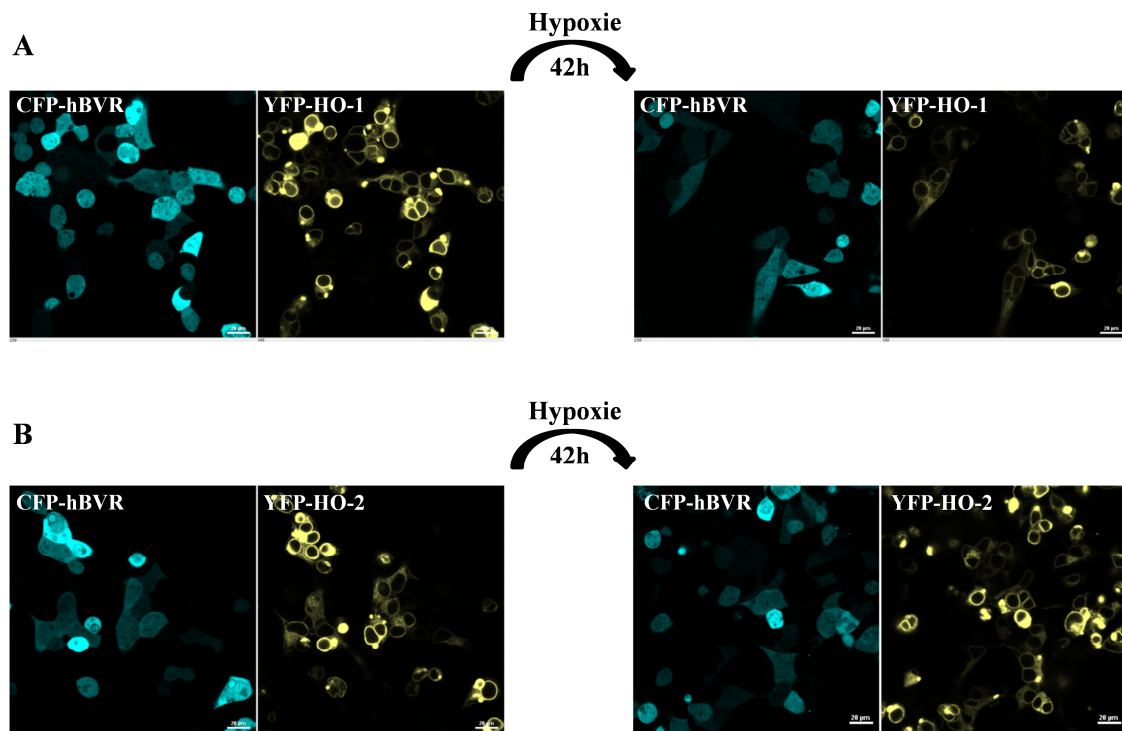


Abbildung 4.15: Einfluss der hBVR auf die Translokation von HO unter hypoxischen Bedingungen in HEK293-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Die hBVR wurde CFP markiert und die HO-Isoenzyme YFP markiert. Ebenso wie die CPR (s. Abbildung 4.14) führt die Kotretransfektion mit der hBVR zu einer Verhinderung der Translokation der HO-1 (A). Die HO-2 mit hBVR (B) zeigt keine Veränderung nach 42 h Hypoxie (1 % Sauerstoff).

Im Gegensatz zu den HO-Isoenzymen ist bei der hBVR die cytosolische Verteilung innerhalb der Zelle deutlich zu erkennen. Die HO-1 und HO-2 sind zu Beginn des Versuches am ER lokalisiert. Nach der Inkubation zeigt die HO-2, wie nach den vorangegangenen Versuchen zu erwarten war, keine Veränderung in ihrer Lokalisation (Abbildung 4.15-B). Auch bei den, mit der HO-1 transfizierten Zellen, sind keine Veränderungen zu erkennen (Abbildung 4.15-A). Die Anwesenheit der hBVR scheint also für die HO-1 einen ähnlichen stabilisierenden Effekt zu haben wie die CPR.

4.1.3.4 Zytotoxizitätsversuche nach Hypoxie-Inkubation

Die Inkubation unter hypoxischen Bedingungen (1 % Sauerstoff) stellt einen sehr hohen Stressfaktor für die Zellen dar. Um auszuschließen, dass die Viabilität der Zellen durch die Inkubation beeinflusst wurde und dies einen Einfluss auf die Lokalisation hatte, wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den GFP-markierten HO-Formen transfiziert. Nach der Expression wurden die Zellen entweder bei normalen Brutbedingungen (Normoxie) oder bei 1 % Sauerstoff (Hypoxie) 42 h inkubiert. Die Viabilität wurde *in vitro* mit Hilfe von umgesetztem MTT in

Formazan photometrisch bestimmt (MTT-Test). Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen, welche unter normoxischen Bedingungen auf 100 % Viabilität gesetzt wurden (Abbildung 4.16). Alle transfizierten Ansätze sind etwas reduziert in ihrer Viabilität, was auf die Transfektion an sich und das damit verbundene reduzierte Zellwachstum zurückzuführen ist. Die Zellviabilität unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie ist bei allen Ansätzen leicht reduziert. Die untransfizierten Zellen zeigten hierbei noch den größten Unterschied mit einer Reduktion der Zellviabilität um rund 25 %. Die Unterschiede zwischen der Inkubation unter Normoxie und der unter Hypoxie sind aber bei keinem Konstrukt signifikant ($p < 0,05$). Somit kann ausgeschlossen werden, dass zytotoxische Effekte Einfluss auf die Translokation der HO-Formen genommen haben.

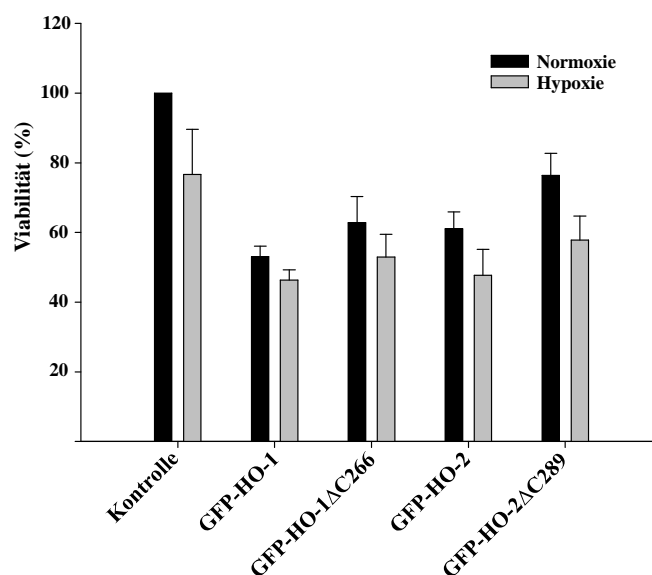


Abbildung 4.16: Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die Viabilität von HEK293-Zellen transfiziert mit GFP-HO mit Hilfe des MTT-Tests. Die Zellen wurden 42 h unter Normoxie oder Hypoxie (1 % Sauerstoff) inkubiert und anschließend untersucht. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM aus sechs Versuchen dar.

4.2 Das CPF-Motiv

4.2.1 Untersuchungen des CPF-Motivs der HO-2

Die HO-1 und die HO-2 sind zu einem großen Anteil (45 %) identisch in ihrer Sequenzhomologie, in den stark konservierten Bereichen sogar bis zu 59 %. Der carboxy-terminale Bereich unterscheidet sich etwas stärker zwischen den Isoenzymen. Ein Hauptunterschied ist hierbei das Vorhandensein zweier Cysteine bei der HO-2 in Position 265 und 282, welche bei der HO-1 nicht vorhanden sind (McCoubrey et al., 1997a). Die Cysteine werden jeweils gefolgt von den Aminosäuren Prolin und Phenylalanin. Das Cystein und das Prolin sind essentieller Bestandteil der HRMs

(Zhang and Guarente, 1995). Bisherige Untersuchungen ergaben, dass die HRMs bei der HO-2 nicht essentiell für die katalytische Aktivität sind (McCoubrey et al., 1997a). Ob ein Einfluss auf die Stabilität der HO-2 vorhanden ist, ähnlich wie bei dem *iron regulatory protein 2* (IRP2) (Ishikawa et al., 2005), wurde bisher noch nicht untersucht.

4.2.1.1 HO-Enzymaktivitätsbestimmung der CPF-Mutante

Die klonierte Doppelmutante HO-2 C265S/C282S, bei der die Cysteine der HRMs durch Serine ersetzt wurden, wurde auf ihre Enzymaktivität im direkten Vergleich mit der HO-2-Form untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Experimenten wurde die *Strep*-tag[®]II-verknüpfte Form eingesetzt. Die Proteine wurden im Sf9-System exprimiert und anschließend im Cytosol auf ihre Aktivität hin untersucht. Sollte die Zerstörung des CPF-Motivs einen Einfluss auf die Stabilität und damit auf die Abhängigkeit von CPR haben, müsste ein deutlicher Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne exogene CPR vorhanden sein.

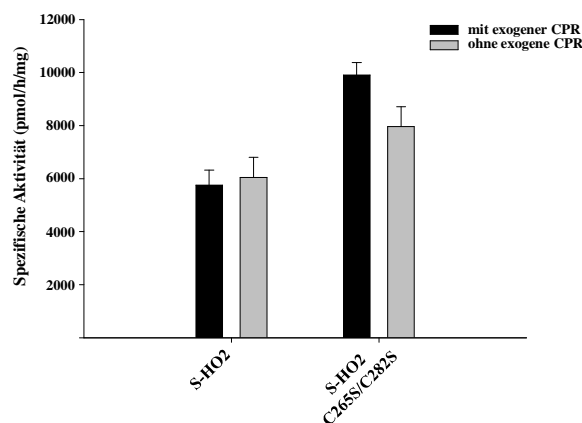


Abbildung 4.17: Aktivitätsbestimmung der HO-2 CPF-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Untersuchungen erfolgten mit (schwarze Balken) und ohne (graue Balken) exogene CPR. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM.

Abbildung 4.17 zeigt für HO-2 C265S/C282S ohne exogene CPR eine Reduktion der Enzymaktivität von ca. 9900 pmol/h/mg auf ca. 7500 pmol/h/mg, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant. Dies deutet darauf hin, dass das CPF-Motiv keinen Einfluss auf die hämabbauende Wirkung der HO hat.

4.2.1.2 Translokationsversuch durch Häm

Häm kann in hohen Konzentrationen Stress auf die Zelle ausüben. Die Arbeitsgruppe um Phyllis A. Dennerly hat in ihren Untersuchungen über die Translokation der HO-1 auch den Einfluss von Häm getestet (Lin et al., 2007). Sie konnten zeigen, dass Häm wie auch Hypoxie eine Translokation der HO-1 bewirkt. Nachdem unsere Experimente ergeben haben, dass es einen Unterschied zwischen den HO-1 und HO-2 in Bezug auf

die Translokation unter Hypoxie gibt (Kapitel 4.1.3.1), sollte nun der Einfluss von Hämin getestet werden. Darüber hinaus sollte getestet werden, ob die An- oder Abwesenheit der CPF-Motive, hierbei einen Einfluss haben könnte.

Die HO-Formen HO-1, HO-2 und HO-2 C265S/C282S wurden amino-terminal mit GFP verknüpft. Nach Expression in HEK293-Zellen wurden diese mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht (s. Abbildung 4.18- Zeitpunkt 0 h). Anschließend wurde eine 10 μ M Hämin-Lösung in DMSO zugegeben und die Zellen im Brutschrank 42 h inkubiert. Die erneute Betrachtung mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop ergab, dass nur die HO-1 eine Translokation in den Zellkern und weg vom ER zeigte. Die HO-2 blieb wie bei dem Hypoxie-Versuch am ER verankert. Zwischen der HO-2 und der Mutante HO-2 C265S/C282S konnte kein Unterschied festgestellt werden. Um auszuschließen, dass die intrazelluläre Hämkonzentration zu gering war, um einen Unterschied zwischen der HO-2 und der HO-2 C265S/C282S zu sehen, wurde in einer weiteren Untersuchung eine Hämkonzentration von 100 μ M getestet. Dies führte aber zu keiner Veränderung des Ergebnisses, weshalb die Daten hier nicht gezeigt sind. Daraus lässt sich schließen, dass das CPF-Motiv und eine dadurch auftretende Hämbindung keinen Einfluss auf die Translokation der HO-2 zu haben scheint.

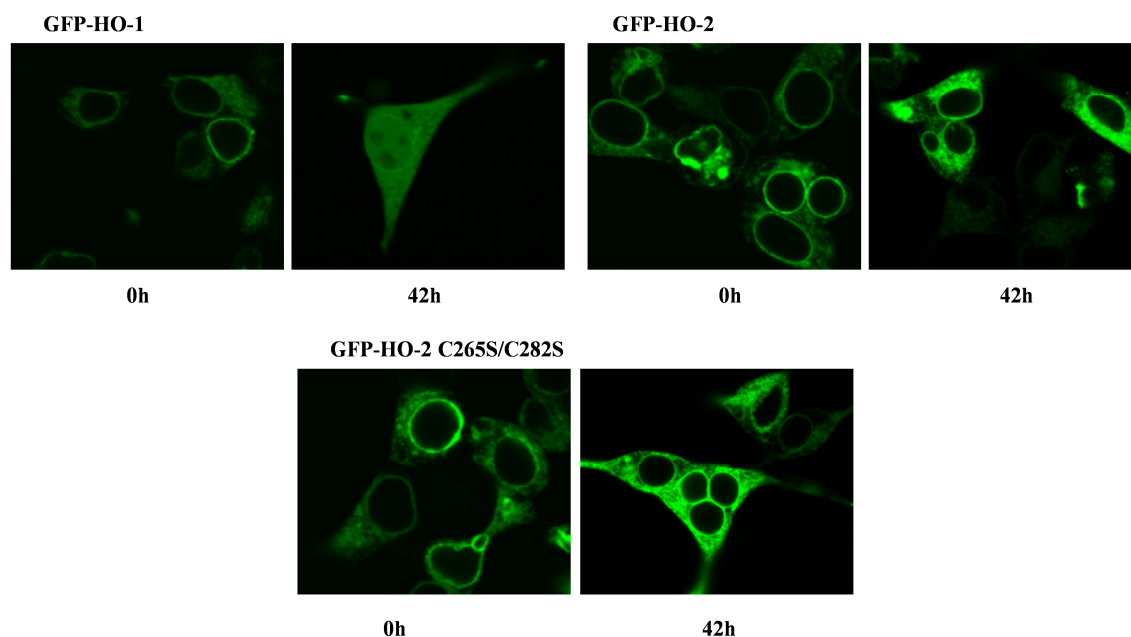


Abbildung 4.18: Translokationsuntersuchungen der HOs nach Hämin-Inkubation (10 μ M) in HEK293-Zellen. Die Untersuchungen erfolgten an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Untersucht wurden GFP-markierte HO-1, HO-2 und die CPF-Mutante HO-2 C265S/C282S. Hämin bewirkte bei HO-1 eine Translokation nach Inkubation für 42 h. Sowohl HO-2 als auch HO-2 C265S/C282S zeigten keine Beeinflussung.

4.2.1.3 Zytotoxizitätsversuche nach Hämin-Inkubation

Analog den Translokationsversuchen unter Hypoxie (Kapitel 4.1.3.4) wurde auch für den Versuch mit Hämin ein Zytotoxizitätsversuch durchgeführt, um auszuschließen, dass die Viabilität der Zellen eine Beeinflussung auf das Ergebnis gehabt haben könnte. Da der Translokationsversuch wie beschrieben mit verschiedenen Häminkonzentrationen durchgeführt wurde, wurde für diesen Test die höhere Konzentration von 100 μ M gewählt. Wie bereits in Kapitel 4.1.3.4 gezeigt, ist die Viabilität der transfizierten Ansätze im Vergleich zum Kontrollansatz reduziert, die transfizierten Zellen befinden sich aber in einem vergleichbaren Viabilitätsbereich. Ein Unterschied zwischen den normal und mit Hämin inkubierten Zellen ist nicht aufgetreten. Die einzelnen HO-Formen inkubiert mit Hämin untereinander unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Viabilität, was für die Vergleichbarkeit des Translokationsergebnisses spricht.

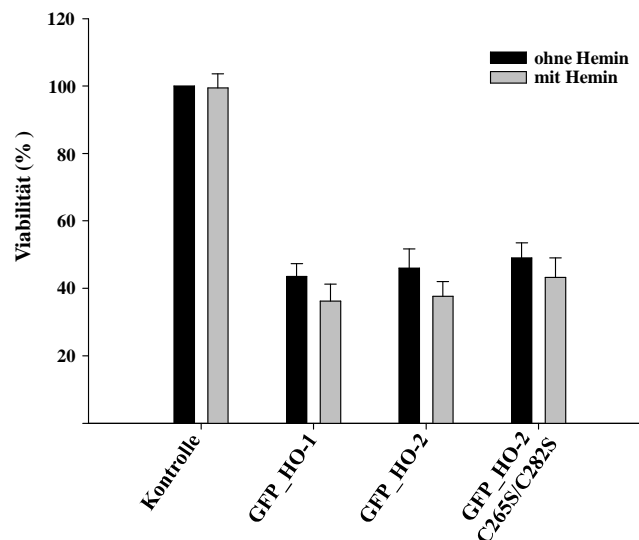


Abbildung 4.19: Untersuchung des Einflusses von 100 μ M Hämin auf die Viabilität von HEK293-Zellen transfiziert mit GFP-HO mit Hilfe des MTT-Tests. Die Zellen wurden 42 h mit 100 μ M Hämin oder dem Lösungsmittel DMSO inkubiert und anschließend untersucht. Transfiziert wurden GFP-HO-1, GFP-HO-2 und GFP-HO-2 C265S/C282S. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM aus sechs Versuchen dar.

4.2.2 Untersuchungen des CPF Motivs der NOsGC-Untereinheit

Sequenzanalysen der Arbeitsgruppe haben ergeben, dass die α_1 -Untereinheit der NOsGC die Aminosäureabfolge CPF in Position 15 (bezogen auf das Cystein) enthält (s. Abbildung 5.1). Wie bereits beschrieben, ist diese Abfolge Bestandteil vieler Hämbindemotive (Zhang and Guarente, 1995). Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine Berichte oder Untersuchungen in Bezug auf das Vorhandensein des Motivs und dessen Funktion in der NOsGC. Da die Aktivierbarkeit der NOsGC als Hämoprotein

abhängig vom Vorhandensein und des Redoxstatus des Häms in der β_1 -Untereinheit ist und bei anderen Proteinen wie z.B. die ALAS oder BACH1 das HRM als Regulierungsfaktor für die Aktivität bekannt ist, sollte dies hier näher untersucht werden (Munakata et al., 2004, Ogawa et al., 2001).

4.2.2.1 Hämin-Abhängigkeit im Vergleich zur CPF-Mutante

Die folgenden Versuche sollten klären, ob Hämin die Aktivierbarkeit der NOsGC beeinflusst und ob das CPF Motiv der α_1 -Untereinheit der NOsGC hierbei eine Rolle spielt. Für die Untersuchungen wurde die Wildtyp NOsGC (α_1/β_1) und die CPF-Mutante $\alpha_1\text{C15S}/\beta_1$ in Sf9-Zellen exprimiert. Es wurde die Enzymaktivität (nmol/mg/min) im Cytosol unter basalen und NO-stimulierten Bedingungen (100 μM DEA/NO) getestet (Abbildung 4.20-B). Dies erfolgte in Anwesenheit aufsteigender Häminkonzentrationen im Bereich von 0,1 bis 100 μM (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100). Unter basalen Bedingungen (Abbildung 4.20-A) ist zu erkennen, dass beide Kurven sich in ihren Verläufen ähneln. Die spezifische Aktivität war bei der kleinsten Häminkonzentration am höchsten, fiel bei 1 μM Hämin stark ab und flachte dann weiter ab, bis die Aktivität bei 100 μM gleichermaßen niedrig war. Die basalen Aktivitäten sind für die C15S-Mutante im Schnitt 6-fach \pm 3 höher im Vergleich zum Wildtyp. Allgemein war zu beachten, dass die basalen Aktivitäten sehr gering waren und deshalb kleinste Schwankungen bei der Messung einen großen Einfluss hatten, womit auch die recht großen Fehlerbalken zu erklären sind. Die spezifischen Aktivitäten unter NO-stimulierten Bedingungen sind im Vergleich zu den Basalaktivitäten deutlich erhöht. Der Anstieg der Häminkonzentration bewirkte erst im späteren Verlauf eine Beeinflussung der Aktivität. Hierbei war auffällig, dass die spezifische Aktivität von α_1/β_1 Wildtyp schon bei 50 μM Hämin stark erniedrigt war, während bei $\alpha_1\text{C15S}/\beta_1$ erst bei 100 μM ein Abfall zu beobachten war.

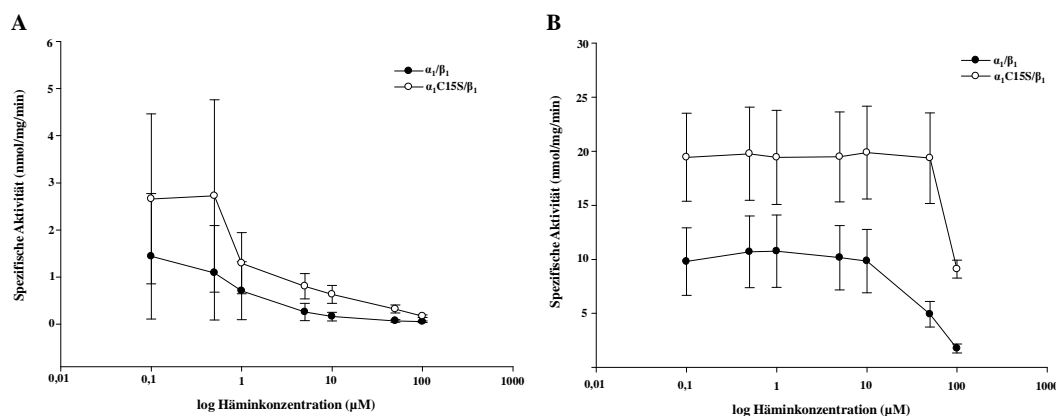


Abbildung 4.20: NOsGC-Aktivitätsbestimmungen im Sf9-Cytosol in Anwesenheit verschiedener Häminkonzentrationen. Untersucht wurden der Wildtyp und $\alpha_1\text{C15S}/\beta_1$. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte unter basalen Bedingungen (A) und in Anwesenheit von 100 μM DEA/NO (B). Die Abszisse zeigt die Häminkonzentration in logarithmischer Darstellung. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte Versuchen \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurden die Enzyme über eine Affinitätschromatografie angereinigt. Dies erfolgte über eine *Strep*-tag[®]II-Verknüpfung der β_1 -Untereinheit, die in beiden Enzymen durch die Verwendung desselben Virus identisch war. Durch die Anreinigung sollte ausgeschlossen werden, dass Störfaktoren im Cytosol die Häminbindung und die Aktivität der Proben beeinflussten. Es wurden nach den Anreinigungen die Enzymaktivitäten in Anwesenheit von verschiedenen Häminkonzentrationen getestet. Durch den Verlust anderer cytosolischer Proteine bei der Anreinigung erhöhte sich die zur Verfügung stehende Häminmenge bezogen auf die NOsGC-Formen. Um diesen Effekt zu berücksichtigen, wurden im Vergleich zu den Untersuchungen im Cytosol zwei niedrigere Häminkonzentrationen (0,001 μM und 0,01 μM) eingesetzt. Die weiteren Konzentrationen waren identisch. Abbildung 4.21-A zeigt das Ergebnis unter basalen Bedingungen. Wie zu erwarten, konnte schon eine geringere Häminkonzentration (0,1 μM) die Aktivität von α_1/β_1 reduzieren. Die basalen Aktivitäten von $\alpha_1\text{C15S}/\beta_1$ waren sehr niedrig, so dass ein nicht allzu großer Unterschied festgestellt werden konnte. Unter NO-stimulierten Bedingungen (100 μM) verschob sich der Abfall der spezifischen Aktivität zu höheren Häminkonzentrationen (Abbildung 4.21-B). Unter Beachtung der Einzeldaten betrug die Häminkonzentration für den Aktivitätsabfall zwischen 10 μM und 50 μM für α_1/β_1 und $\alpha_1\text{C15S}/\beta_1$. Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante, der bei den cytosolischen Untersuchungen aufgetreten war, konnte bei diesem Experiment nicht bestätigt werden. Die allgemein höhere Aktivität von α_1/β_1 konnte evtl. darauf zurückzuführen sein, dass bei Wildtyp und Mutante die Komplexbildung zwischen der α und der β Untereinheit unterschiedlich stark ausgeprägt war und bei der Mutante vermehrt β_1 -Dimere vorlagen, die die Gesamtaktivität reduzierten.

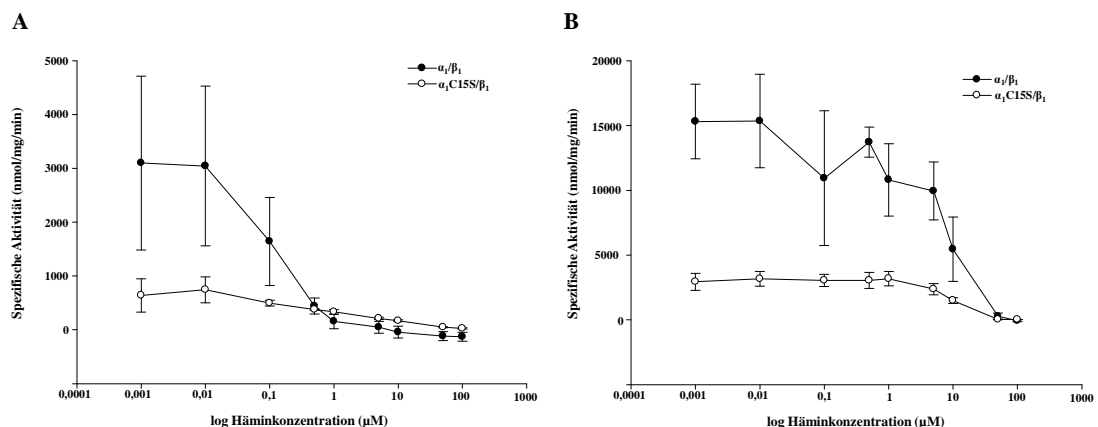


Abbildung 4.21: NOSGC-Aktivitätsbestimmungen nach der Anreinigung in Anwesenheit verschiedener Häminkonzentrationen. Untersucht wurden der Wildtyp und $\alpha_1\text{C15S}/\beta_1$. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte unter basalen Bedingungen (A) und in Anwesenheit von 100 μM DEA/NO (B). Die Abszisse zeigt die Häminkonzentration in logarithmischer Darstellung. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte Versuchen \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

4.2.2.2 Bestimmung des Redox-Potenzials

Da an Protein gebundenes Häm das oxidative Milieu ändern kann, sollte untersucht werden, ob die Mutation des CPF-Motivs einen Einfluss auf das Redox-Potential der NOsGC besitzt. Für die Untersuchungen wurden die α_1 - und die α_1 C15S-Untereinheit mit dem Redoxsensor GRX1roGFP2 verknüpft und diese Konstrukte jeweils in HEK293-Zellen exprimiert. Für ein weiteres Experiment wurde zusätzlich auch die β_1 -Untereinheit exprimiert. Die Untersuchungen wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei den Wellenlängen 405 nm und 488 nm und die Emissionsmessung im Bereich von 500-550 nm. Durch die anschließende Berechnung des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten (Ratio), konnte eine Aussage über den Redoxstatus getroffen werden.

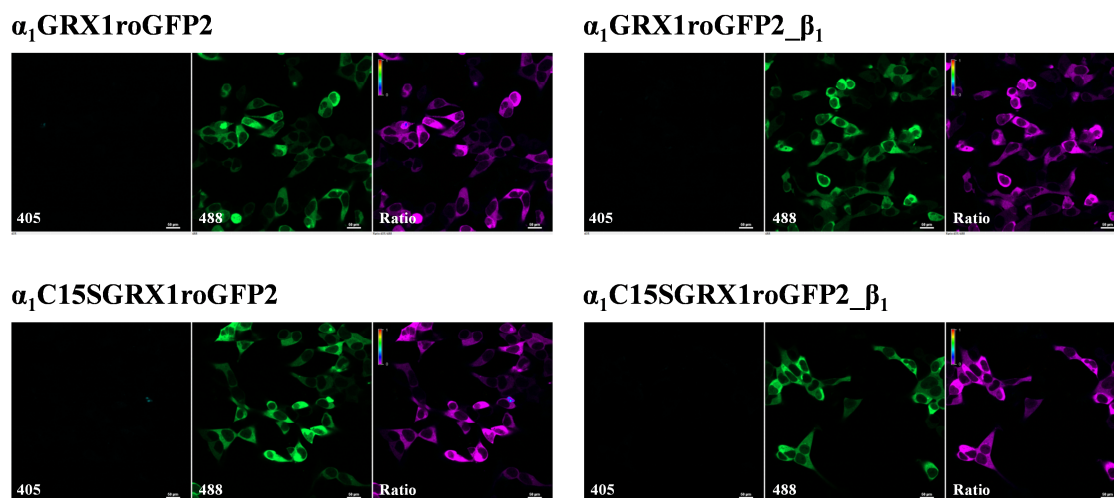


Abbildung 4.22: Untersuchung des Redox-Potentials der NOsGC und der CPF-Mutante in HEK293-Zellen. Die α_1 -Untereinheit bzw. α_1 C15S war an den Redoxsensor GRX1roGFP2 gekoppelt und wurde alleine oder in Kombination mit der β_1 -Untereinheit exprimiert. Die Anregung erfolgte bei 405 nm und bei 488 nm. Der Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 405 nm und 488 nm ist durch die Ratio dargestellt. Die Färbung ist durch die Farbskala (0-1) bestimmt. Es sind keine Unterschiede der verschiedenen Transfektionen zu erkennen. Der weiße Balken entspricht einer Größe von 50 μ m.

Der Vergleich der Farbintensitäten der Ratio-Aufnahmen (jeweils rechtes Foto) ergab keinen Unterschied zwischen α_1 und α_1 C15S. Auch die Koexpressionen mit der β_1 -Untereinheit zeigte keine Beeinflussung. Bei allen vier Ansätzen zeigte die Anregung bei 405 nm keine detektierbare Fluoreszenz (jeweils linkes Foto). Bei der Anregung mit 488 nm trat hingegen eine Fluoreszenz entsprechend der Verteilung der NOsGC in der Zelle auf (jeweils mittleres der drei Fotos). Es schien also bei keinem Ansatz eine Verschiebung in den oxidierten Bereich stattgefunden zu haben. Bei den Versuchen wurde davon ausgegangen, dass intrazellulär vorhandenes Häm ausreichte, um Veränderungen bewirken zu können.

4.3 Die NOsGC und die HO

In vivo wurde das Zusammenspiel zwischen der Hämoxxygenase und der NOsGC bereits untersucht und beschrieben (Jones et al., 2010). Eine moderate Aktivierung der NOsGC durch CO ist auch *in vitro* beschrieben (Brune et al., 1990, Stone and Marletta, 1994, Kharitonov et al., 1995). Da es sich bei der NOsGC um ein Hämoprotein handelt, liegt die Vermutung nahe, dass die HO die NOsGC über den Hämabbau beeinflussen kann. Dies sollte durch die folgenden Versuche untersucht werden.

4.3.1 Untersuchungen der NOsGC-HO-Koexpression

Die Fragestellung hinter den Versuchen war, ob eine gemeinsame Expression von HO und NOsGC zu einer funktionalen NOsGC führt. Die Anwesenheit der HO könnte in der Zelle eine Reduktion des Hämgehaltes bewirken, was den Einbau des Häms in die NOsGC beeinflussen könnte. Hierfür wurden Sf9-Zellen mit Viren codierend für die α_1 - und β_1 -Untereinheit der NOsGC und der HO-Isoenzyme -1 oder -2 infiziert. Bei einem Ansatz wurde die hBVR an Stelle der HO koinfiziert, um einen evtl. auftretenden Expressionsunterschied durch die Verwendung eines dritten Virus auszuschließen. Weiterhin wurden an Stelle der aktiven HO-Isoenzyme inaktive Mutanten (HO-1 H25A und HO-2 H45A) als Kontrollen eingesetzt.

4.3.1.1 HO-Enzymaktivitätsbestimmung der inaktiven Mutanten

Bevor die in der Literatur beschriebenen inaktiven Mutanten (vgl. Kapitel 3.2.2.3 und 3.2.2.4) für den Koexpressionsversuch eingesetzt wurden, wurde eine Enzymaktivitätsuntersuchung im Vergleich zu den Wildtyp-HO-Formen durchgeführt (Abbildung 4.23). Die Untersuchung erfolgte im Sf9-Cytosol. Die Aktivität (mit und ohne CPR) von HO-1 H25A war stark reduziert im Vergleich zu HO-1 um ca. das 5-fache, sie war allerdings noch feststellbar. Diese war sogar noch ausreichend hoch, dass die für die HO-1 charakteristische CPR-Abhängigkeit detektierbar war. Die Reduktion der Aktivität um das 11-fache war bei der HO-2 H45A Mutante im Vergleich zur HO-2 etwas stärker ausgeprägt, auch wenn sie nicht gegen Null ging. Trotz der Restaktivität wurden die inaktiven Mutanten als Kontrolle für die weiteren Versuche eingesetzt, da zumindest Tendenzen bei einem Effekt erkennbar sein müssten.

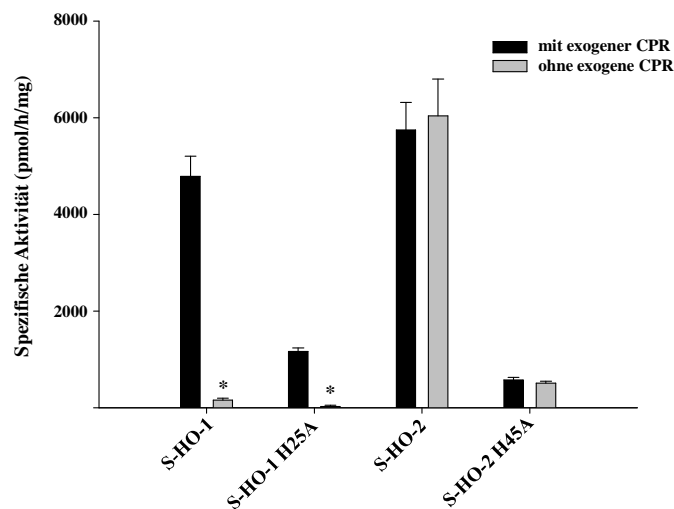


Abbildung 4.23: Aktivitätsbestimmung der inaktiven HO-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Untersuchungen wurden in Anwesenheit von exogener CPR (schwarze Balken) und ohne exogene CPR (graue Balken) durchgeführt. Die Messwerte repräsentieren Mittelwerte aus drei Versuchen \pm SEM. Die CPR-Abhängigkeit für HO-1 und HO-1 H25A ist signifikant (* $p < 0,05$).

4.3.1.2 Enzymaktivitätsuntersuchungen der NOsGC-HO-Koexpression

Die Enzymaktivitätsuntersuchungen der NOsGC-HO-Koexpressionen wurden im Sf9-Cytosol durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten unter basalen und NO-stimulierten (100 μ M DEA/NO) Bedingungen. Weiterhin wurde der NOsGC-Aktivator Cinaciguat in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt, wodurch Unterschiede in der Hämhaltigkeit bzw. des Redoxzustandes des Häms untersucht werden konnten. Zusätzlich wurden die Kombinationen DEA/NO mit dem sGC-Inhibitor ODQ 30 μ M und Cinaciguat mit ODQ 30 μ M untersucht. Das Ergebnis der Aktivitätsbestimmungen ist in Form der Aktivierung (%) bezogen auf die α_1/β_1 Basalaktivität dargestellt (die Basalaktivitäten sind in Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25 identisch). Der Vergleich der Basalaktivitäten zeigt keine Verminderung durch die Koexpression eines weiteren Enzyms. Die Basalaktivitäten sind sogar leicht erhöht im Vergleich zu α_1/β_1 alleine. Bei der NO-Stimulierung sind größere Unterschiede erkennbar (Abbildung 4.24). Die Anwesenheit von HO-1 und HO-2 führte zu einer verringerten Stimulierung durch NO im Vergleich zu α_1/β_1 (16,5 \pm 1,5-fache Stimulierung). Hierbei war die Beeinflussung von HO-2 größer als die von HO-1 (2,0 \pm 0,4 bei HO-2 vs. 4,7 \pm 1,4 bei HO-1). Die verminderte Aktivierbarkeit könnte auf eine reduzierte Hämhaltigkeit des Enzyms NOsGC zurückzuführen sein. Die inaktiven Mutanten HO-1 H25A und HO-2 H45A führten auch zu einer reduzierten NO-Stimulierung allerdings war die Beeinflussung nicht so groß wie die bei den aktiven HO-Formen (7,6 \pm 2,9 für HO1 H25A und 9,2 \pm 1,3 für HO2 H45A). Dies war zu erwarten nach dem in Versuch 4.3.1.1 eine Restaktivität der inaktiven Mutanten festgestellt wurde. Die Anwesenheit der zu Kontrollzwecken eingesetzten hBVR führte zu einer höheren Stimulierbarkeit um den

Faktor 1,4 bezogen auf die α_1/β_1 -Stimulierung. Sowohl die Reduktion der NO-Stimulierungen durch die HO-Formen als auch die Erhöhung durch hBVR waren hierbei signifikant (* $p < 0,01$ und # $p < 0,05$). Die Anwesenheit von ODQ zeigte keine signifikante Beeinflussung der NO-Stimulierbarkeit. Dies ist bei allen Ansätzen gleich.

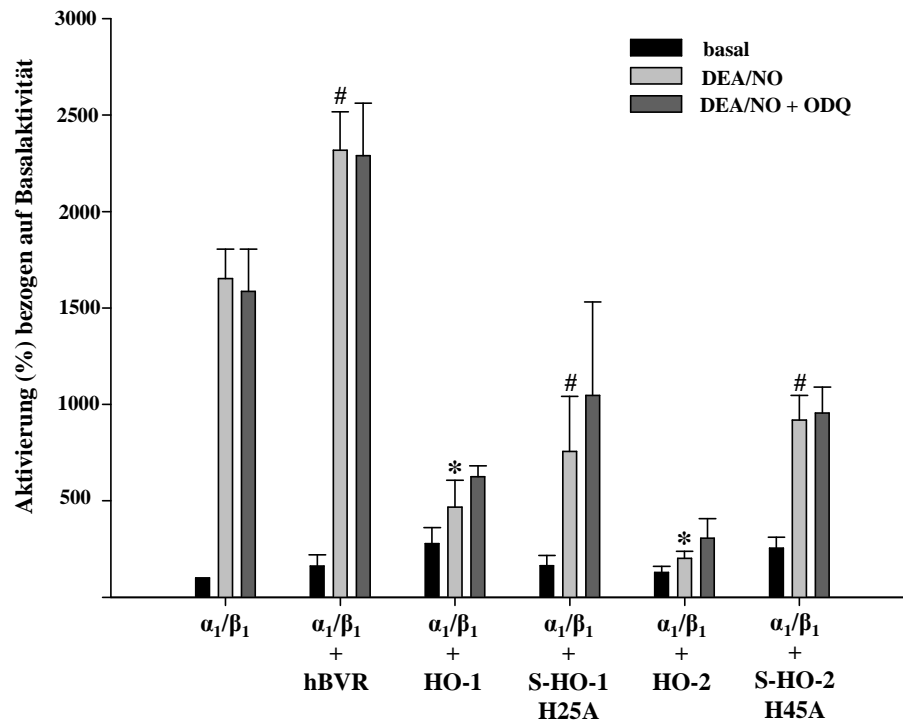


Abbildung 4.24: NOsGC-Aktivitätsbestimmung in Anwesenheit von DEA/NO und DEA/NO mit ODQ im Sf9-Cytosol. Die Einzelinfektion und die Koinfektionen wurden unter basalen Bedingungen (schwarze Balken), unter Zugabe von 100 μ M DEA/NO (hellgraue Balken) oder 100 μ M DEA/NO mit ODQ 30 μ M (dunkelgraue Balken) untersucht. Zur Infektion wurden Viren für α_1 und β_1 alleine, oder in Kombinationen mit Viren für die hBVR und für die entsprechenden HOs (HO-1, S-HO-1 H25A, HO-2 und S-HO-2 H45A) verwendet. Die spezifische Aktivität ist als Aktivierung (%) in Bezug auf die Basalaktivität von α_1/β_1 angegeben. Das Ergebnis stellt die Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchen dar. Die Beeinflussung der NO-Stimulierbarkeit in Bezug auf die NOsGC alleine ist statistisch signifikant (* $p < 0,01$ und # $p < 0,05$).

Die Untersuchung der Enzymaktivität in Anwesenheit des sGC-Aktivators Cinaciguat (Abbildung 4.25) konnte nur teilweise das Ergebnis aus dem vorangegangenen Versuch mit NO bestätigen. Die Koexpression von HO-1 führte zu einer 1,4-fach höheren Stimulierung in Anwesenheit von Cinaciguat als bei α_1/β_1 alleine ($8,8 \pm 0,9$ vs. $6,2 \pm 1,0$). Dies könnte die Vermutung einer geringeren Hämhaltigkeit der NOsGC bestätigen. Bei der HO-2 hingegen, war die Aktivierung durch Cinaciguat nur knapp halb so groß wie bei der HO-1 ($3,2 \pm 1,0$). Allerdings war keiner der Unterschiede hierbei signifikant. Unter Berücksichtigung der Standardfehler scheinen sowohl die inaktiven Mutanten HO-1 H25A und HO-2 H45A als auch die Kontrolle hBVR keinen Einfluss auf die Stimulierbarkeit unter Cinaciguat zu haben. Die Anwesenheit von ODQ

fürte bei α_1/β_1 und bei der Koexpression von hBVR zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivierung durch Cinaciguat im Vergleich zu Cinaciguat alleine (* $p < 0,05$). Die Koexpression der inaktiven HO-Formen führte zwar auch zu einer leichten Erhöhung der Aktivierbarkeit in Anwesenheit von ODQ, welche auch etwas größer war als die der aktiven Formen, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Die Beeinflussung durch ODQ könnte wiederum ein Hinweis auf unterschiedliche Hämhaltigkeit der NOsGC in den verschiedenen Expressionsansätzen sein.

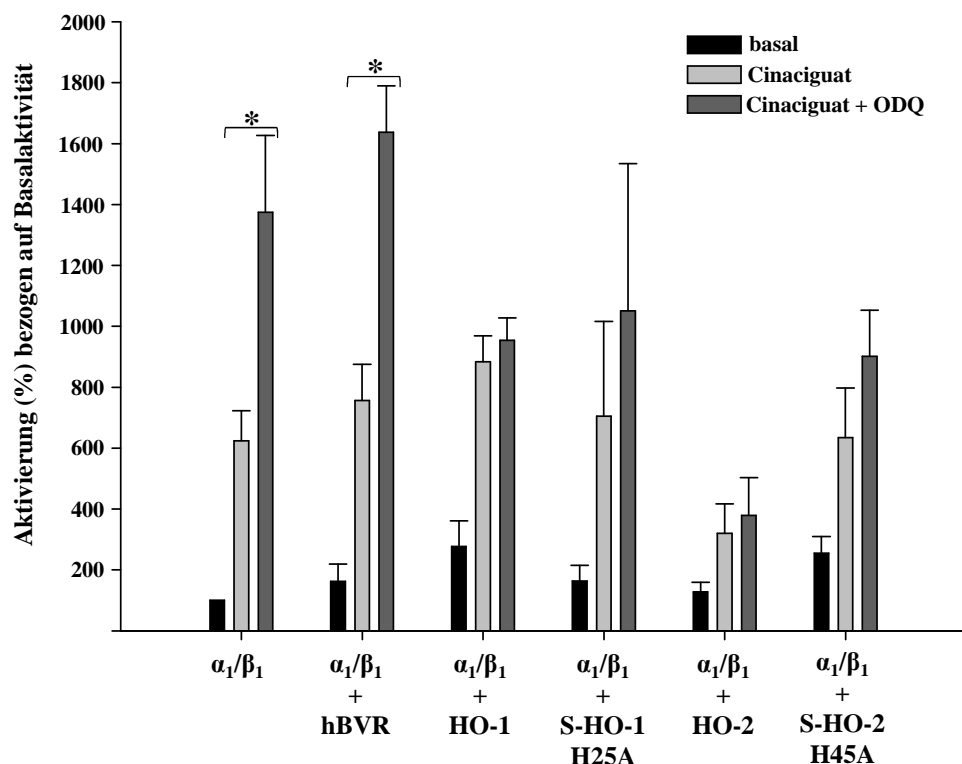


Abbildung 4.25: NOSGC-Aktivitätsbestimmung in Anwesenheit von Cinaciguat und Cinaciguat mit ODQ im Sf9-Cytosol. Die Einzelinfektion und die Koinfektionen wurden unter basalen Bedingungen (schwarze Balken), unter Zugabe von 10 μ M Cinaciguat (hellgraue Balken) oder 10 μ M Cinaciguat mit ODQ 30 μ M (dunkelgraue Balken) untersucht. Zur Infektion wurden Viren für α_1 und β_1 alleine, oder in Kombinationen mit Viren für die hBVR und für die entsprechenden HOs (HO-1, S-HO-1 H25A, HO-2 und S-HO-2 H45A) verwendet. Die spezifische Aktivität ist als Aktivierung (%) in Bezug auf die Basalaktivität von α_1/β_1 angegeben. Das Ergebnis stellt die Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Versuchen dar. Der Unterschied in der Aktivierung zwischen Cinaciguat mit und ohne ODQ ist statistisch signifikant (* $p < 0,05$).

4.3.1.3 Expressionsuntersuchung der NOsGC-HO-Koexpression

Um weiterhin zu untersuchen, ob die in Kapitel 4.3.1.2 festgestellten Enzymaktivitätsunterschiede auf Expressionsunterschiede der NOsGC zurückzuführen sind, wurde eine SDS-Page durchgeführt. Die dort eingesetzten cytosolischen Proben von α_1/β_1 und der Koinfektionen mit hBVR, HO-1, HO-1 H25A, HO-2 und HO-2 H45A wurden aufgetrennt und anschließend einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Für die

Immunodetektion wurden Primärantikörper gegen die α_1 - und β_1 -Untereinheit verwendet. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper konnten Banden auf Höhe der entsprechenden Molekulargewichte detektiert werden (79 kDa für α_1 und 70 kDa für β_1 -Abbildung 4.26 unten). Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und die der Einzelinfektion auf 100 % gesetzt. Die Expression der α_1 -Untereinheit war durch die Anwesenheit von HO-1 und HO-2 vermindert, die Reduktion durch die HO-2 um knapp die Hälfte war statistisch signifikant (* $p < 0,05$). Die inaktiven Mutanten HO-1 H25A und HO-2 H45A und die zur Kontrollzwecken eingesetzte hBVR beeinflussten die Expression hingegen nicht (Abbildung 4.26). Die Auswertung der β_1 -Untereinheit hingegen ergab eine Erhöhung bei den Koinfektionen mit HO-1 H25A, HO-2 H45A in Bezug zu der Einzelinfektion α_1/β_1 . Die Kontrolle hBVR erhöhte diese sogar um das 2,7-fache. Die Erhöhungen bei HO-1 H25A und hBVR waren hierbei statistisch signifikant ($^{\#}p < 0,05$). Die Anwesenheit von HO-2 führt wie erwartet zu einer Reduktion der β_1 -Bandenintensität, die HO-1 wiederum hatte eine leicht erhöhte Expression zur Folge. Beide Beeinflussungen waren aber nicht signifikant.

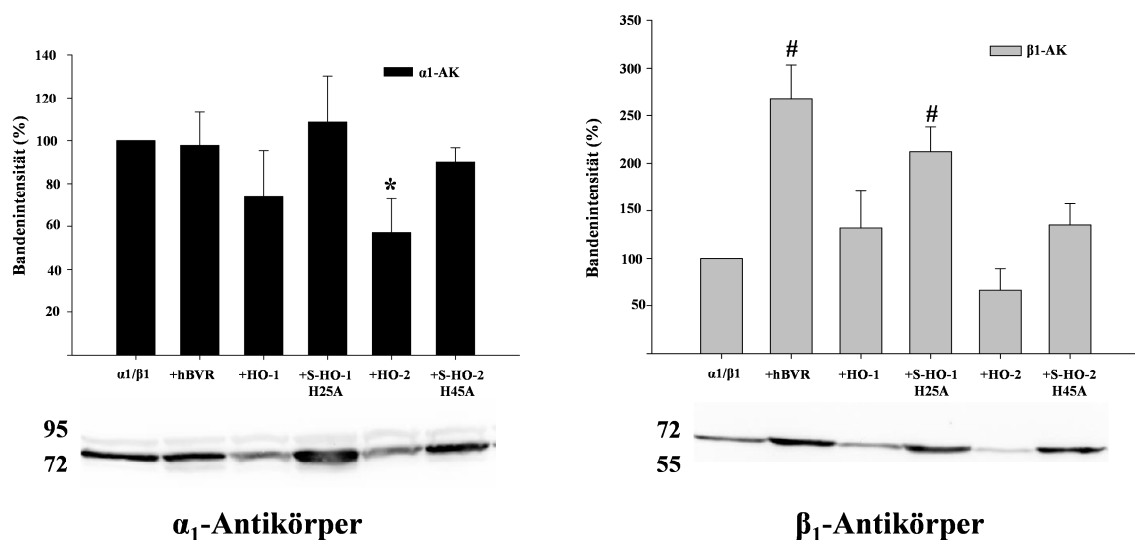


Abbildung 4.26: Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analyse der NOsGC-HO-Koinfektion. Die Detektion der Western-Blots erfolgte mit dem jeweiligen Antikörper gegen die α_1 -Untereinheit und der β_1 -Untereinheit der NOsGC. Darüber ist die Auswertung der Bandenintensität dargestellt, die Banden der Einzelinfektion wurden als 100 % gesetzt. Für die Bestimmung wurden drei unabhängige Versuche verwendet und das Ergebnis als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Reduktion (*) und die Erhöhung (#) der Expressionen in Bezug zu α_1/β_1 sind statistisch signifikant ($p < 0,05$)

5 Diskussion

5.1 Die HO

Die HOs bauen prooxidatives Häm zu Biliverdin ab, welches weiter durch die Biliverdinreduktase zu dem antioxidativ wirkenden Bilirubin reduziert wird. Bei der erstgenannten Reaktion wird neben Eisen auch CO freigesetzt, welches in geringem Maße die NOsGC aktivieren kann und dadurch auch einen Einfluss auf das Herz-Kreislaufsystem besitzt.

Enzymaktivitätsbestimmungen der HOs *in vitro* werden in der Regel mit Rattenlebercytosol durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass sowohl die für die Bestimmung nötigen Enzyme BVR und CPR, als auch die weiterhin benötigten Co-Faktoren in physiologischen Mengen vorhanden sind. Eine genauere Untersuchung des Zusammenspiels zwischen den HOs und der CPR ist hierbei nicht möglich. Die Verwendung des eukaryotischen Sf9-Systems ermöglicht es auch größere Enzyme, wie die CPR mit 77 kDa, zu exprimieren. Somit können alle für die Enzymaktivitätsbestimmung benötigten Enzyme rekombinant hergestellt werden. Durch die damit mögliche flexible Versuchsgestaltung bei der Enzymaktivitätsbestimmung konnte eine interessante Entdeckung gemacht werden. Entgegen der Erwartung erreichte die HO-2 volle spezifische Aktivität, obwohl keine exogene CPR im Versuchsansatz vorhanden war. Die HO-1 hingegen zeigte eine deutliche CPR-Abhängigkeit in Bezug auf ihre enzymatische Aktivität. Dies deutet auf bisher nicht beschriebene Unterschiede zwischen den beiden HO-Isoenzymen und der Wechselwirkung mit der CPR hin, die in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht wurden.

Die Fähigkeit der HO-2, Häm auch ohne Zugabe von CPR in den Versuchsansätzen abzubauen, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Sf9-Zellen endogen CPR enthalten, die für die Reaktion ausreichend ist. Das Unvermögen der HO-1, Häm in diesen Versuchsansätzen abzubauen, könnte auf eine unzulängliche Wechselwirkung der HO-1 mit der endogenen CPR zurückzuführen sein. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die HO-1 im Gegensatz zur HO-2 einen weiteren Faktor benötigt, der nach der Cytosolaufbereitung nicht mehr vorhanden ist. Da es bisher keinerlei Hinweise darauf gibt, dass die beiden HO-Isoenzyme unterschiedliche Co-Faktoren für den Hämabbau benötigen, wurde in den weiterführenden Untersuchungen das Augenmerk auf die CPR-Wechselwirkungen gelegt.

Vergleichende Untersuchungen in Cytosol und Homogenisat zeigten, dass die HO-1 im Homogenisat ebenfalls volle Enzymaktivität aufweist. Die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit der endogenen CPR schien somit vorhanden zu sein, ging aber mit der Cytosolaufbereitung für die HO-1, im Gegensatz zur HO-2, verloren. Das Problem

der Instabilität der HO ist hinreichend bekannt (Ishikawa et al., 1991). Aus diesem Grund werden häufig carboxy-terminal verkürzte HO-Mutanten eingesetzt, da diese Formen zwar enzymatisch aktiv sind, aber nicht aggregieren und auch nicht so leicht abgebaut werden. Der carboxy-terminale Bereich der beiden HO-Isoenzyme dient als Membrananker für das ER, wo auch die CPR verankert ist. Für die HO-1 konnte gezeigt werden, dass die Interaktion dabei die spezifische Aktivität erhöht (Huber and Backes, 2007, Huber et al., 2009). Der Erhalt der Aktivität der verkürzten Mutanten resultiert daraus, dass die Bindestellen für die CPR und für die hBVR außerhalb des Carboxy-Terminus liegen (Wang and de Montellano, 2003, Higashimoto et al., 2008). Der Aminosäurevergleich zeigt, dass die Bindestellen für die HO-1 und die HO-2 identisch sind (s. Abbildung 1.1). Dies konnte in unseren Versuchen mit den carboxy-terminal verkürzten Mutanten bestätigt werden. Diese waren sowohl im Cytosol als auch im Homogenisat aktiv, konnten aber nicht mit der endogenen CPR interagieren. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der HO-1-Wildtyp während der Cytosolaufbereitung seinen carboxy-terminalen Schwanz verloren hat. Die HO-2 hingegen scheint im Vergleich stabiler zu sein. Die Enzymaktivitätsbestimmungen nach der Anreinigung ergaben sowohl für die HO-1 und die HO-2, als auch für die carboxy-terminal verkürzten Mutanten eine Abhängigkeit von exogen zugegebener CPR. Dies kann dadurch erklärt werden, dass bei der Anreinigung über die *Strep*-tag[®]II-verknüpften HO-Formen die endogene CPR abgereinigt wurde und somit nicht mehr vorhanden war.

Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche CPR-Interaktion im Cytosol könnte auch eine unterschiedliche Affinität zwischen HO-1, HO-2 und der CPR sein. Um dies zu untersuchen, wurden Versuche zur Bestimmung der CPR-Konzentrationsabhängigkeit durchgeführt. Dafür wurden den angereinigten HO-Proben aufsteigende Mengen an CPR zugesetzt und die Enzymaktivität bestimmt. Für eine unterschiedliche Interaktion zwischen den HO-Isoenzymen und der CPR ergaben sich keine Hinweise. Die signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen mit den carboxy-terminal verkürzten Mutanten, bestätigen hingegen die Wichtigkeit des Membranankers.

Koexpressionsuntersuchungen der HO-Formen und der CPR mit anschließender Anreinigung über die *Strep*-tag[®]II-verknüpften HOs sollten Aufschluss darüber geben, ob die Wechselwirkungen zwischen überexprimierter HO und CPR ausreichend sind für eine gemeinsame Anreinigung und ob anschließend Aktivitätsunterschiede festgestellt werden können. Sowohl die Western-Blot-Analyse als auch die Aktivitätsbestimmungen zeigten, dass eine gemeinsame Anreinigung von HO-1/HO-2 und CPR möglich ist. Es konnte hierbei kein Unterschied zwischen den HO-Isoenzymen festgestellt werden. Eine gemeinsame Anreinigung der carboxy-terminal verkürzten Mutanten mit der CPR fand, wie zu erwarten war, nicht statt. Für die Anreinigung wurde wie bei den Aktivitätsversuchen eine Cytosolaufbereitung durchgeführt. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Carboxy-Terminus der

HO-1 allerdings weiterhin vorhanden ist. Dies könnte auf einen stabilisierenden Effekt der CPR auf die HO-1 schließen lassen. Die HO-2 hingegen scheint keine Instabilität bei der Cytosolaufbereitung aufzuweisen. Zur direkten Untersuchung der Interaktion zwischen HO und CPR wurden die Fluoreszenzprotein-verknüpften Formen in HEK293-Zellen koexprimiert. Die anschließend durchgeführten FLIM-Untersuchungen führten allerdings zu keinen Unterschieden zwischen HO-1 und HO-2. In der intakten Zelle sind die HO-1 und HO-2, ebenso wie die CPR im ER verankert. Bei den FLIM-Untersuchungen wirkte keine mechanische Belastung auf die Enzyme, was eine Bestätigung für die Rolle der Enzymaufbereitung bei den Aktivitätsversuchen ist. Die reduzierten FRET-Effizienzen der carboxy-terminal verkürzten HO-Formen, die in der Zelle cytosolisch vorliegen und damit weniger gut mit der CPR wechselwirken können, entsprachen ebenfalls den Erwartungen. Bei den FRET-Bestimmungen der, in Sf9-Zellen exprimierten, Enzyme konnte ein Unterschied bei den Untersuchungen im Cytosol und im Homogenisat für die HO-1 festgestellt werden. Diese waren vergleichbar mit denen bei den Aktivitätsuntersuchungen. Die Ergebnisse bestätigen damit die Vermutung, dass die HO-1 bei der Cytosolaufbereitung ihren Membrananker verliert und dadurch die Interaktion mit der CPR beeinträchtigt ist. Dies steht allerdings nicht im Einklang mit der Theorie, dass die Koexpression der CPR einen stabilisierenden Effekt auf die HO-1 ausübt. Eine Erklärung könnte sein, dass die Stabilisierung durch die CPR nicht bei der ganzen Menge an gebildeter HO-1 möglich war und dadurch ein Teil der HO-1 nach der Cytosolaufbereitung doch verkürzt vorlag. Die bei der HO-2 festgestellten reduzierten FRET-Effizienzen könnten ein Hinweis auf die Oligomerisierung der HO-2 sein. Zumindest konnte für Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer-(BRET)-Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Donor-Selbstassoziation den Energie-Transfer reduzieren kann (James et al., 2006).

Durch FRET-Experimente konnte kürzlich gezeigt werden, dass Oligomerisierung essentiell für die Stabilität und Funktion der HO-1 ist. Dies ist abhängig von einem intakten Carboxy-Terminus (Hwang et al., 2009). Untersuchungen für die HO-2 in diesem Zusammenhang sind bisher nicht veröffentlicht. Die hier durchgeführten Gelfiltrationsuntersuchungen zeigten für die HO-2, dass die Oligomerisierung viel stärker ausgeprägt ist als die der HO-1. Überträgt man nun das Ergebnis von Hwang et al 2009 auf die HO-2, ist dies eine Erklärung für die höhere Stabilität der HO-2. Das Zusammenspiel von HO-1 mit CPR wiederum führt zu einem Oligomerisierungsgrad, vergleichbar mit dem der HO-2 alleine. Dieser Einfluss wurde ebenfalls durch BRET-Untersuchungen bestätigt (Marohnic et al., 2011). Die dort gefundenen Ergebnisse führten aber nur zu vagen Vermutungen über den Einfluss von CPR auf die HO-1-Multimerbildung. Die Untersuchung der Oligomerisierung mit Hilfe von FLIM brachte keinen Unterschied zwischen HO-1 und HO-2. Im Gegenteil, das Ergebnis zeigt sogar eine geringere FRET-Effizienz für die HO-2. Dies lässt sich dadurch begründen, dass die Lebenszeiten von HO-2 bei den alleinigen Donormessungen kürzer waren, als die von HO-1. Dadurch fiel die Verkürzung in Anwesenheit des Akzeptors insgesamt für

die HO-2 geringer aus. Die kürzeren Donor-Lebenszeiten der HO-2 können auf das Auftreten von Homo-FRET von CFP zurückgeführt werden (Grailhe et al., 2006). Dadurch kann eine Verfälschung des Ergebnisses auftreten.

Die Arbeitsgruppe um Phyllis A. Dennery zeigte, dass Hypoxie zu einer Translokation der HO-1 in den Zellkern führt und dass dies mit der Verkürzung der HO-1 an ihrem carboxy-terminalen Ende einhergeht (Lin et al., 2007). Die nukleäre HO-1 vermag die Bindung von Transkriptionsfaktoren, welche bei oxidativem Stress involviert sind, zu verändern und sie kann eine Autoregulation bewirken. Da dies auch der katalytisch inaktiven Form zugeschrieben wird, bedeutet dies, dass es unabhängig von der Hauptfunktion, dem Hämabbau und der Bildung von CO geschieht (Lin et al., 2007, Lin et al., 2008). Unsere Untersuchungen konnten die Translokation von HO-1 in den Zellkern unter hypoxischen Bedingungen (1 % Sauerstoff) bestätigen und darüber hinaus zeigen, dass die Koexpression der CPR diese verhindern kann. Dies ist ein weiterer Beweis für den stabilisierenden Effekt der CPR auf die HO-1. Die CPR ist somit nicht nur essentiell für die enzymatische Funktion der HO-1. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sie an der Regulierung der Menge an nukleärer HO-1 beteiligt ist und somit die Genexpression beeinflussen kann. Dies ist in der Hinsicht bedeutsam, da die CPR ein sehr polymorphes Gen ist (Miller et al., 2011, Gomes et al., 2009), Mutationen im Genpromotor auftreten können (Huang et al., 2008) und auch beim Menschen angeborene Gendefekte mit einhergehenden Mangelsymptomen beschrieben sind (Fluck et al., 2004). Dies geht auch einher mit den kürzlich gezeigten Ergebnissen, dass CPR-Mutationen die HO-1 Enzymaktivität und die Oligomerisierung beeinflussen können (Marohnic et al., 2011).

Die Translokationsversuche der HO-2 zeigten, dass die Translokation unter hypoxischen Bedingungen in den Zellkern ausbleibt. Das Auftreten der Fluoreszenz ist sauerstoffabhängig. Dass die Hypoxie Einfluss auf die detektierte Fluoreszenz haben könnte und deshalb im Zellkern keine HO-2 detektiert werden konnte, kann allerdings bei den durchgeführten Versuchen ausgeschlossen werden. Für GFP konnte gezeigt werden, dass Sauerstoffkonzentrationen von 0,1 ppm (entsprechend 0,00001 %) zu keiner Beeinträchtigung der Fluoreszenz führen (Hansen et al., 2001). Dies ist ein viel niedriger Konzentrationsbereich als der bei diesen Versuchen. Weiterhin waren die Versuchsdurchführungen für HO-1 und HO-2 identisch und für die HO-1 konnte eine Translokation in den Nukleus gezeigt werden. Es scheint also eine Isoenzym-spezifische Eigenschaft der HO zu sein. Der gezeigte erhöhte Oligomerisierungsgrad der HO-2 könnte hierfür eine Erklärung sein. Weiterhin könnte aber auch eine an sich erhöhte Stabilität des Carboxy-Terminus der HO-2 ursächlich sein. Möglich wäre auch das Fehlen einer Erkennungssequenz für proteolytische Enzyme, die bei Hypoxie induziert werden. Obwohl beide HO-Isoenzyme eine hohe Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen, ist gerade der Carboxy-Terminus am wenigsten identisch (15 % Übereinstimmung). Dies könnte eine Erklärung für die gefundenen

Unterschiede sein. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch bei der HO-2 in der intakten Zelle ein tryptischer Verdau des Carboxy-Terminus und damit eine nukleäre Translokation auftreten kann. Zumindest ist das Auftreten einer carboxy-terminal verkürzten HO-2 nach Überexpression in *E.coli*-Zellen beschrieben (Ishikawa et al., 1995). Dass die Verkürzung am carboxy-terminalen Ende zu einer nukleären Lokalisation führt, konnte durch unsere Versuche mit HO-2 Δ C289 gezeigt werden. Die Expression von HO-2 in eukaryotischen Zellen führt allerdings zu einer stabilen Form, die unter hypoxischen Bedingungen nicht in den Zellkern transloziert, ebenso wie bei der Inkubation mit Hämin (s. CPF-Motiv). Die Arbeitsgruppe um Sylvain Doré konnte zeigen, dass Stressfaktoren unterschiedliche Auswirkungen auf Zellen haben, die die HO-Isoenzyme exprimierten. Versuche mit Hydroperoxid führten zu Zellschäden, die durch die Anwesenheit der HO-Isoenzyme abgeschwächt wurden. Zellen, in denen die HO-1 exprimiert wurde, waren allerdings weniger resistent gegen die Toxizität als die HO-2 exprimierenden Zellen. Die HO-2 wurde bei den Versuchen nur in Mikrosomen gefunden, während die HO-1 zusätzlich im Cytosol zu finden war. Dadurch war die enzymatische Aktivität der HO-1 abgeschwächt (Kim et al., 2005c).

In der Literatur gibt es Hinweise, dass die HO-2 unter physiologischen Bedingungen als Sauerstoffsensor für einen BK_{Ca}-Kanal in Glomuszellen der Karotis- und Aortengefäße fungiert (Williams et al., 2004, Adachi et al., 2004b, Zhang et al., 2006a). Das durch die HO-2 gebildete CO hält die Kalium-Kanal Aktivität unter normoxischen Bedingungen aufrecht. Hypoxie führt hingegen zu einer reduzierten CO-Bildung und zu einer erhöhten Hämmenge. Dies führt zum Verschluss des BK_{Ca}-Kanals und zu einer Depolarisation. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die HO-2 unter Hypoxie nicht weg vom ER in den Nukleus transloziert. Es konnte kürzlich aber gezeigt werden, dass sie unter hypoxischen Bedingungen durch Bildung von Dithiolgruppen an den HRMs reversibel inaktiviert werden kann, da dies zu einer Erhöhung des K_d-Wertes für Häm führt (Yi and Ragsdale, 2007, Yi et al., 2009). Es scheint also, dass beide HO-Isoenzyme unter hypoxischen Bedingungen inaktiviert werden, nur auf unterschiedliche Weise, welche aber auch ihren physiologischen Aufgaben entsprechen: Die induzierbare HO-1 wird inaktiviert durch irreversiblen tryptischen Verdau und Translokation in den Zellkern weg von der CPR. Die konstitutiv-aktive HO-2 hingegen wird reversibel durch den Redox-Zustand der Cysteine der HRMs inaktiviert. Es gibt zwar auch Hinweise, dass die Expression der HO-2 durch Hypoxie beeinflusst werden kann, allerdings war dies bei den Untersuchungen *in vitro* stark abhängig von der verwendeten Zelllinie (Zhang et al., 2006b). Das unterschiedliche Verhalten der beiden Isoenzyme unter hypoxischen Bedingungen hat noch weitergehende Auswirkungen: So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass eine wechselseitige Abhängigkeit existiert zwischen der HO-Aktivität und der Aktivität von Cytochrom P450 durch die Konkurrenz bei der CPR-Bindung (Reed et al., 2011). Die Translokation der HO-1 weg vom ER führt zu einer Erhöhung der CPR-Menge, welche dann für Cytochrom P450 zur Verfügung steht (Szczena-Skorupa et al., 2003). Die Inaktivierung der HO-2 muss nicht zwangsläufig zu einer

Veränderung der CPR-Bindung führen. Da wir zeigen konnten, dass die CPR die Translokation der HO-1 verhindern kann, führt dies zu einer weiteren Komplexität zwischen HO-1, CPR und Cytochrom P450. Hypoxie könnte also nicht nur einen direkten Einfluss auf den Häm-Metabolismus haben, sondern auch einen indirekten Effekt auf den Stoffwechsel von Arzneistoffen.

Wang und de Montellano konnten zeigen, dass die Bindestellen für die CPR und die hBVR an der HO-1 weitgehend identisch sind (Wang and de Montellano, 2003). Obwohl die hBVR ein cytosolisches Protein ist und nicht wie die CPR an dem ER verankert ist, zeigten unsere Untersuchungen, dass auch die hBVR die Translokation der HO-1 unter hypoxischen Bedingungen verhindern kann. Ob sie es vermag, ebenso wie die CPR, den Oligomerisierungsgrad der HO-1 zu erhöhen, oder ob die Bindung der hBVR an die HO-1 vor dem proteolytischen Abbau schützt, muss noch weiter untersucht werden.

Zusammenfassend lassen sich folgende, aus der Arbeit gewonnene, Erkenntnisse über die HO-Isoenzyme gegenüberstellen:

| Eigenschaft | HO-1 | HO-2 |
|--------------------------|-------------|-------------|
| Oligomerisierungsgrad | niedriger | höher |
| nukleäre Translokation | ja | nein |
| Stabilisierung durch CPR | nötig | nicht nötig |

5.2 Das CPF-Motiv

Ein bedeutender Unterschied zwischen der HO-1 und der HO-2, neben der Lokalisation im Körper und der Induzierbarkeit der HO-1, ist das Vorhandensein von HRMs in der HO-2. Zwei der HRMs im carboxy-terminalen Bereich bestehen aus den Aminosäuren Cystein, Prolin und Phenylalanin, weshalb in dieser Arbeit auch der Begriff CPF-Motiv analog verwendet wird. Das Cystein in einem HRM ist für die Bindung des Häms verantwortlich. Das nachfolgende Prolin ist für die Bindung nicht essentiell, erhöht aber die Affinität von Häm zu den HRMs (Zhang and Guarente, 1995). Die HRMs der HO-2 besitzen hämbindende Eigenschaften, sie sind aber nicht an dem Hämabbau beteiligt (McCoubrey et al., 1997a). Die Arbeitsgruppe um Stephen W. Ragsdale fand heraus, dass die Schwefelatome der beiden Cysteine aus den CPFs in der Lage sind eine Disulfidbrücke auszubilden, wodurch die Affinität zu Häm erhöht wird. (Yi and Ragsdale, 2007). Zur Klärung der Frage, ob die CPF-Motive mitverantwortlich sind für das unterschiedliche Verhalten der beiden Isoenzyme in Bezug auf die Stabilität und die Oligomerisierung, wurden die beiden Cysteine an den Positionen 265 und 282 mutiert. Das dritte Cystein an Position 127 wurde nicht mutiert, da diesem bisher keine Rolle bei

der Hämregulierung zugeschrieben wurde, zumal für eine Disulfidbrückenbildung auch kein Partner mehr zur Verfügung stehen würde. Zunächst wurde eine Enzymaktivitätsuntersuchung im Sf9-System durchgeführt. Würden die CPF-Motive eine Rolle bei der Stabilität der HO-2 haben, so müsste bei den Cytosoluntersuchungen ein vergleichbares Ergebnis wie bei der HO-1 zu erwarten sein. Die Untersuchungen zeigten hingegen, dass sich die HO-2-Mutante C265S/C282S genau wie der HO-2-Wildtyp bezüglich der Wechselwirkung mit der endogenen CPR verhält. Ein Unterschied bezüglich der Hämaffinität konnte bei diesem Versuch im Vorfeld vernachlässigt werden, da Häm im Überschuss (25 μ M), also weit über der physiologischen Konzentration, im Versuchsansatz zur Verfügung stand.

Die Translokation der HO-1 kann nicht nur durch hypoxische Bedingungen, sondern auch durch Hämin hervorgerufen werden (Lin et al., 2007). Hierüber gibt es zwar auch gegenteilige Ergebnisse (Yanatori et al., 2010), unsere Translokationsversuche bestätigten aber die Wirkung von Hämin auf die HO-1. Wie auch bei den Hypoxieversuchen blieb die Translokation der HO-2 durch Hämin aus. Durch die Inkubation mit Hämin sollte ausgetestet werden, ob die CPF-Motive mitverantwortlich für die Stabilitätsunterschiede der HO-2 sind. Die Mutation der CPF-Motive führte aber auch hier zu keinem unterschiedlichen Verhalten im Vergleich zu dem Wildtyp. Die im Anschluss durchgeführten Zytotoxizitätsuntersuchungen deuteten auf keine Unterschiede zwischen allen eingesetzten HO-Formen hin. Hieraus lässt sich schließen, dass die CPF-Motive keinerlei Einfluss auf die Stabilität besitzen. Es lässt sich an dieser Stelle aber nur vermuten, dass sie ebenfalls keinen Einfluss auf den Oligomerisierungsgrad der HO-2 besitzt. Dies müsste in weitergehenden Untersuchungen getestet werden. Würde die erhöhte Stabilität der HO-2 doch auf das Fehlen von Schnittstellen von proteolytischen Enzymen zurückzuführen sein, wäre das Ergebnis auf jeden Fall plausibel, da die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden mutierten Cysteine hierbei eine Rolle spielen, sehr gering ist.

Die NOsGC ist ein Hämoprotein, dessen Aktivierung sehr stark von dem Redoxzustand des Häm-Moleküls und der Hämhaltigkeit abhängig ist (Fritz et al., 2011). Der Verlust der Hämgruppe erhöht den proteosomalen Abbau (Meurer et al., 2009). Innerhalb des Enzyms einen Regulator zu haben, der Einfluss auf die Hämaffinität und damit die Aktivität hat, würde einen großen Vorteil darstellen. HRMs wurden inzwischen in vielen verschiedenen Proteinen identifiziert, wo sie unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Die ALAS1 besitzt HRMs, die für die Häm-vermittelte Inhibierung des mitochondrialen Imports der ALAS1 notwendig sind. Von den drei vorhandenen HRMs sind, ähnlich zur HO-2, nur zwei an der Inhibierung beteiligt. Dies wurde auf die Art der Aminosäurenabfolge, auf die Position im Protein und auf die Distanz zwischen den HRMs zurückgeführt (Munakata et al., 2004). Die Aktivität des Transkriptionsfaktors BACH1 wird ebenfalls über die Hämbindung an das HRM reguliert. Durch die Bindung von Häm an BACH1 wird dieser inhibiert, indem er nicht mehr an *Maf recognition*

elements auf der DNA binden kann. Dadurch können Gene aktiviert werden, die z.B. für die Bildung von Globinen verantwortlich sind. Die Hämbindung an BACH1 erfolgt in der C-terminalen Region, welche vier Abfolgen von Cystein und Prolin enthält (Ogawa et al., 2001). Im Gegensatz dazu, ist bei der Regulierung der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors HAP1 in Hefen nur ein HRM essentiell (Zhang and Guarente, 1995), sechs weitere HRMs regulieren die DNA-Bindedomäne. Die Bindung von Häm bewirkt eine Dissoziation von HAP1 und seinem zellulären Repressor, wodurch HAP1 an die DNA binden kann und die Transkription aktiviert wird (Zhang and Guarente, 1994). Dies sind Beispiele, bei denen die HRMs die Aktivität der Proteine regulieren. IRP2 enthält ein HRM, das die Häm-vermittelte Ubiquitylierung und die anschließende Degradation regulieren kann. Die Bindung von Häm (Fe^{2+}) an das Cystein an Position 201 und die Bindung von Häm (Fe^{3+}) an das Histidin an Position 204 könnten als Redox-Regulator dienen und dadurch die Erkennung durch die Häm-oxidierte IRP2-Ubiquitin-Ligase-1 steuern (Ishikawa et al., 2005). Sowohl eine Steuerung der Aktivität als auch die Regulierung des Abbaus könnte für die NOsGC wichtig sein. Tatsächlich haben Aminosäuresequenz-Analysen der NOsGC ergeben, dass die α_1 -Untereinheit der NOsGC eine Abfolge von Aminosäuren enthält, welche dem HRM-Motiv der HO-2 entspricht. An Position 15 der Aminosäuresequenz α_1 -Untereinheit befindet sich ein Cystein auf das ein Prolin und ein Phenylalanin folgt. Dieses CPF-Motiv, wie auch die Aminosäuren am Amino-Terminus davor, sind über mehrere Spezies hinweg konserviert. Direkt nach dem CPF-Motiv nimmt hingegen die Konservierung stark ab (Abbildung 5.1). Ein Vergleich der Aminosäuren der α_1 - mit der α_2 - Untereinheit der NOsGC ergab, dass an der äquivalenten Position auf der α_2 -Untereinheit (Aminosäure 29) ebenfalls ein Cystein gefolgt von einem Prolin zu finden ist. Da der amino-terminale Bereich der beiden Untereinheiten wenig Übereinstimmung zeigt, könnte die Konservierung des Motivs ein Hinweis auf eine physiologische Bedeutung sein.

| | | | | |
|------------------------|----------------|-------|--|----|
| α_1 (Mensch) | MFCTKLKDLKITGE | CPF | SLLAPGQVPNESSEEAAGSSES-CKATVPICQDIPEKNIQESL | 59 |
| α_1 (Maus) | MFCRKFKDLKITGE | CPF | SLLAPGQVPKEPTEEVAGGSEG-CQATLPICQYFPEKNAEGSL | 59 |
| α_1 (Ratte) | MFCRKFKDLKITGE | CPF | SLLAPGQVPTEPIEEVAGVSES-CQATLPTCQEF AE-NAEGSH | 58 |
| α_1 (Rind) | MFCAKLKDLQITGD | CPF | SLLAPGQVPREPLGEATGSGPASTPGQPGVCPGVPDKNPPGRL | 60 |
| α_1 (Reisfisch) | MFCAKLKELKISGE | CPF | SSSAKNNELGDFEERS-----SDAADSLPISEDVH-GKIRENV | 54 |
| | *** | ***** | * : | |

Abbildung 5.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der α_1 -Untereinheit der NOsGC verschiedener Spezies. Gelb hinterlegt ist das CPF-Motiv. Der Vergleich wurde mit der Alignmentfunktion von UniProtKB durchgeführt, welche das Programm Clustal O verwendet. Konservierte Aminosäuren sind durch „*“ gekennzeichnet, starke und schwache Konservierungen durch „:“ und „.“.

Die Untersuchung des CPF-Motivs der NOsGC erfolgte mit Hilfe von Abhängigkeitsuntersuchungen in Anwesenheit von Hämin. Zum Vergleich wurde eine Mutante untersucht, bei der das Cystein an Position 15 zu einem Serin mutiert wurde. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte im Cytosol und nach Anreinigung des

Enzyms. Erste Hinweise, dass das CPF-Motiv einen Einfluss auf die Enzymaktivität in Anwesenheit von Häm in besitzt, konnten nach der Anreinigung nicht mehr bestätigt werden. Die erfolgte Anreinigung über die β_1 -Untereinheit bringt den Nachteil mit sich, dass vermehrt katalytisch inaktive β_1 -Homodimere angereinigt werden (Zabel et al., 1999). Der Grad der funktionalen Heterodimerbildung lässt sich in der Praxis nicht überprüfen, kann aber das Ergebnis stark beeinflussen. Die Aussagekraft von cytosolischen Untersuchungen sind normalerweise geringer im Vergleich zu Untersuchungen mit angereinigten Proteinen. In diesem Fall sollte der Effekt im Cytosol aber nicht vernachlässigt werden. Untersuchungen mit angereinigtem Protein, bei dem die α_1 -Untereinheit mit einem *Strep*-tag[®]II versehen ist, sollten hier durchgeführt werden.

Die Untersuchung des oxidativen Milieus im Innern einer HEK293-Zelle, in der die α_1 -Untereinheit bzw. die α_1 C15S-Untereinheit exprimiert wurden, ergab keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante. Die zusätzliche Expression der β_1 -Untereinheit hatte ebenfalls keinen Einfluss. Dies bestätigt für den Wildtyp andere Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe (Kraehling et al., 2011). Dort zeigte allerdings eine amino-terminal verkürzte Form der α_1 -Untereinheit eine Änderung des Redox-Potentials, was evtl. auf das Fehlen des CPF-Motivs hätte zurückgeführt werden können. Allgemein war bei der Anwendung der Methode auffällig, dass sie anfällig war auf Schwankungen, hervorgerufen durch Expressionsunterschiede der Proteine. So konnte in Zellen, in denen viel Protein exprimiert wurde, ein anderer Redoxzustand, entsprechend einem reduzierteren Milieu, beobachtet werden im Vergleich zu weniger stark exprimierenden Zellen.

Die bisherigen Ergebnisse konnten noch keine Hinweise auf eine Funktion der Aminosäuresequenz CPF der NOsGC geben. Photometrische Hämbindungsuntersuchungen für die α_1 -Untereinheit könnten hier weiteren Aufschluss geben, ob das CPF-Motiv auch als HRM fungiert. Alleinige Untersuchungen der α_1 -Untereinheit sind allerdings auf Grund der Instabilität der α_1 -Untereinheit schwierig (Wagner et al., 2005). Bei der Koexpression mit der β_1 -Untereinheit würde die gebundene Hämgruppe stören, weshalb die hämfreie Mutante β_1 H105A verwendet werden müsste. Weiterhin könnte auch entscheidend sein, dass die Experimente *in vitro* durchgeführt wurden und nicht *in vivo*. So existieren auch unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Hämwirkung bei der ALAS2. Eine Inhibierung des mitochondrialen Imports konnte *in vitro* gezeigt werden (Lathrop and Timko, 1993), bei Experimenten *in vivo* konnte dies nicht bestätigt werden (Munakata et al., 2004). Die Arbeitsgruppe um Diana Imhof veröffentlichte Untersuchungen, die zur Charakterisierung und zur Einordnung von Hämbindemotiven und HRMs beitragen sollen (Kuhl et al., 2011, Kuhl et al., 2013). Die dort angewandten Methoden wie UV/Vis-, Raman- oder Kernspinresonanz-(NMR)-Spektroskopie könnten Aufschluss auf Funktion des CPF-Motivs bei der NOsGC geben.

5.3 Die NOsGC und die HO

Die HO zeigt *in vivo* Einfluss auf die Funktionalität der NOsGC und damit auf die von ihr hervorgerufenen Wirkungen wie z.B. die Vasorelaxation. Interessanterweise gibt es über die Effekte gegensätzliche Literatur. Transgene Mäuse, welche die HO-1 in der glatten Gefäßmuskulatur dauerhaft überexprimierten, zeigten eine verminderte NO-vermittelte Vasodilatation (Imai et al., 2001). Der Effekt wurde auf die erhöhte CO-Konzentration zurückgeführt, welche beim Abbau von Häm durch die HO entsteht. Die resultierende reduzierte Ansprechbarkeit der NOsGC wurde darauf zurückgeführt, dass CO, als partieller Agonist, in Anwesenheit von NO antagonistisch wirkt. Dies überwiegt der Fähigkeit von CO, die NOsGC direkt, wenn auch in geringem Maße, zu aktivieren (Brune et al., 1990, Stone and Marletta, 1994, Kharitonov et al., 1995). Untersuchungen in der Retina von Schildkröten zeigten, dass CO potenzierend auf die NO-vermittelte cGMP-Bildung wirken kann, indem es NO aus einem intrazellulären Vorrat verdrängen kann (Cao et al., 2000, Cao and Eldred, 2003). Untersuchungen mit HO-1-defizienten Mäusen zeigten eine stark reduzierte Ansprechbarkeit der NOsGC auf NO, was die Verfasser auf die Oxidation und den daraus resultierenden Verlust der Hämgruppe der NOsGC zurückführten (Jones et al., 2010). In jungen Ratten konnte gezeigt werden, dass eine Induktion der HO-1 zu einer Abschwächung von Bluthochdruck über die Beeinflussung der NOsGC führen kann. In erwachsenen Ratten blieb der Effekt allerdings aus (Ndisang et al., 2002).

Um die Komplexität der Interaktion von HO und NO/cGMP-Signalweg weitergehend zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit auf ein eukaryotisches Expressionssystem zurückgegriffen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine verminderte Aktivierbarkeit der NOsGC durch NO in Anwesenheit von HO-1. Die Beeinflussung durch die HO-2 war sogar noch deutlicher ausgeprägt. Die inaktiven HO-Mutanten zeigten eine verminderte Beeinflussung der Aktivität im Gegensatz zu den Wildtyp-Formen, was in Korrelation steht mit der verbleibenden katalytischen Aktivität der HO-Mutanten. Die ausgebliebene Beeinflussung der NO-Aktivierbarkeit durch den Inhibitor ODQ, welcher das Eisenatom der Hämgruppe in den dreiwertigen Zustand zu oxidieren vermag (Schrammel et al., 1996), würde dafür sprechen, dass die NOsGC durch die Anwesenheit der HOs bereits in der Hämhaltigkeit reduziert ist. Erstaunlicherweise blieb aber auch die α_1/β_1 -Einzelfektion unbeeinflusst. Dies würde auf den ersten Blick dafür sprechen, dass die Wirkung des ODQs trotz Einhaltung der Inkubationsbedingungen nicht vollständig eingesetzt hatte, bevor das NO zugesetzt wurde. Das Ergebnis bei der Aktivierung durch Cinaciguat wiederum zeigte einen deutlichen Effekt von ODQ bei der α_1/β_1 -Einzelfektion und bei der Koexpression der Kontrolle hBVR. Das Ausbleiben des Effekts durch ODQ bei den Koexpressionen mit HO-1 und HO-2 könnte darauf hindeuten, dass entweder die NOsGC hämfrei vorliegt, oder das gebildete CO an die Hämgruppe gebunden hat, wodurch die Aktivierung durch NO reduziert ist. Sollte die NOsGC hämfrei vorliegen, könnte dies daran liegen, dass

primär die Hämgruppe in Anwesenheit der HO nicht eingebaut wurde. Zur Klärung könnte ein weiterführendes Experiment beitragen, bei dem die NOsGC nach der Koexpression mit den HO-Formen angereinigt und die Hämhaltigkeit photometrisch bestimmt wird. Weiterhin könnte auch das Biliverdin, welches bei dem Abbau von Häm durch die HOs entsteht, die Ursache für die verminderte NOsGC-Aktivität sein. So konnte bereits gezeigt werden, dass Biliverdin einen NOsGC-Inhibitor darstellt (Koglin and Behrends, 2002). Der zu Grunde liegende Mechanismus konnte bei den Untersuchungen nicht ausreichend geklärt werden, allerdings war er abweichend von dem von ODQ. Die vergleichbare Stimulierung durch den Aktivator Cinaciguat von den Koexpressionen und der Einzelexpression spricht aber eher dafür, dass eine Beeinflussung der Hämgruppe durch Oxidation stattgefunden hat. Der aktivitätssteigernde Effekt durch die Anwesenheit der hBVR könnte auf das Antioxidans Bilirubin zurückzuführen sein, welches das Eisenatom der Hämgruppe im zweiwertigen Zustand halten kann. Untersuchungen von Koglin und Behrends konnten zwar keinen direkten Einfluss von Bilirubin auf die NOsGC zeigen, allerdings wurde hier Bilirubin nur bei der Aktivitätsbestimmung zugegeben und war nicht im Vorfeld vorhanden (Koglin and Behrends, 2002). Die antioxidative Wirkung des Bilirubins könnte vor allem in der intakten Zelle einen Einfluss auf den Oxidationszustand der Hämgruppe haben.

Nach dem Verlust der Hämgruppe ist der Abbau der NOsGC erhöht (Stasch et al., 2006, Hoffmann et al., 2009). Würde ein verminderter NOsGC-Gehalt die Ursache für die verminderte Aktivierung durch NO sein, könnte dies durch die Expressionsuntersuchung mittels Western-Blot bestätigt werden. Die Anwesenheit von HO-2 führt tatsächlich zu einem verminderten NOsGC-Gehalt, die Reduktion der α_1 -Untereinheit ist hierbei statistisch signifikant ($p < 0,05$). Dies geht konform mit der stärksten Beeinflussung der HO-2 bei den Enzymaktivitätsbestimmungen und auch der verminderten Aktivierung durch Cinaciguat. Die stärkere Beeinflussung der α_1 -Untereinheit im Vergleich zur β_1 -Untereinheit ist auf eine erhöhte Instabilität der α_1 -Untereinheit zurückzuführen, welche dann auch zu einem erhöhten Abbau führt (Wagner et al., 2005). Die anderen Koexpressionen hingegen führten zu keinen signifikanten Reduktionen der α_1 - oder β_1 -Untereinheit. Die Erhöhung der β_1 -Bandenintensitäten bei den Koexpressionen von hBVR und S-HO-1 H25A bei gleichbleibender Bandenintensität für α_1 könnte hingegen für eine β_1 -Homodimerisierung sprechen. Eine Erklärung für den stabilisierenden Effekt der hBVR auf die β_1 -Untereinheit könnte auch hier dadurch begründet werden, dass das antioxidative Reaktionsprodukt Bilirubin die Hämgruppe im 2-wertigen Zustand hält. Weiterhin kann Bilirubin die NADPH-Oxidase inhibieren was zu einer Reduzierung von oxidativem Stress durch verminderte Bildung von Superoxid-Anionen führt (Datla et al., 2007). Der Expressionsanstieg für die β_1 -Untereinheit bei der Koexpression von S-HO-1 H25A lässt sich hierdurch nicht erklären, es fehlt auch die Korrelation mit der Enzymaktivitätsbestimmung. Für die inaktive Mutante konnte allerdings nach

Inkubation mit Hydroperoxiden eine Hochregulierung von Katalase und eine Erhöhung der Glutathionspiegel gezeigt werden, was zu einer Abschwächung der Zelltoxizität führte (Hori et al., 2002). Somit können auch der inaktiven Mutante antioxidative Effekte zugeschrieben werden, die unabhängig vom Hämabbau sind. Um den Effekt der Expressionssteigerung der β_1 -Untereinheit auf die Aktivität genauer zu untersuchen, könnte die Expression eines Fusionsproteins aus der α_1 - und β_1 -Untereinheit hilfreich sein. Bei der Verwendung dieses Fusionsproteins werden die beiden Untereinheiten immer in äquivalenten Mengen gebildet (Haase et al., 2010a).

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die HOs die NOsGC in ihrer Expression und Aktivität beeinflussen können. Das ganze hämabbauende System, inklusive der hBVR und deren Reaktionsprodukt, dem Bilirubin, steht in enger Verknüpfung mit dem NO/cGMP Signalweg. Oxidativer Stress stellt nicht nur die Hauptursache für Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar, er vermindert auch den Behandlungserfolg durch momentan auf dem Markt befindliche Therapeutika. Die Problematik der verminderten Aktivierbarkeit der NOsGC im oxidierten Zustand konnte durch die Entdeckung der Aktivatoren wie Cinaciguat oder Ataciguat verringert werden. Diesen Substanzen wird ein großes therapeutisches Potential in der Behandlung von Herz-Kreislauserkrankungen wie z.B. der Angina-Pectoris zugeschrieben. Wir konnten zeigen, dass die HOs das empfindliche System der NOsGC auf oxidative Veränderungen beeinflussen können und dass hBVR einen protektiven Effekt ausüben kann. Die HOs werden momentan im Zusammenhang mit vielen, im Menschen vorkommenden, Krankheiten erforscht. Als therapeutisches Zielprotein werden sie allerdings zum derzeitigen Stand noch nicht verwendet. Es wäre also denkbar, dass sich dies in Zukunft vor allem auch in Bezug auf die Therapie von Herz-Kreislauserkrankungen ändern könnte. Zu beachten hierbei ist aber, vor allem bei der therapeutischen Induktion der HO-1, das kleine Fenster zwischen antioxidativer und prooxidativer Wirkung.

6 Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HO-Isoenzyme sich in ihrer Stabilität bezüglich des Carboxy-Terminus unterscheiden. Die erhöhte Stabilität der HO-2 konnte auf einen höheren Oligomerisierungsgrad zurückgeführt werden. Dies könnte die Ursache für das unterschiedliche Translokationsverhalten der Isoenzyme bei der Inkubation unter Hypoxie sein. Ein weiterer Beleg hierfür ist, dass die Anwesenheit von CPR zu einer Stabilisierung der HO-1 führte und die Translokation der HO-1 unter hypoxischen Bedingungen ausblieb. Ein weiterer Unterschied zwischen den Isoenzymen ist das Vorhandensein von CPF-Motiven bei der HO-2. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass die CPF-Motive keinerlei Einfluss auf die Stabilität und die Enzymaktivität haben. Das Ausbleiben der Translokation der HO-2 in den Zellkern wird ebenfalls nicht durch die CPF-Motive beeinflusst.

Untersuchungen zum CPF-Motiv, das in der α_1 -Untereinheit der NOsGC identifiziert werden konnte, zeigten keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und einem Enzym mit mutiertem CPF-Motiv bezüglich der Enzymaktivität und des Redoxstatus in der Zelle. Weiterführende Experimente sollten hierbei durchgeführt werden, da bisher noch nicht ausreichend geklärt werden konnte, welche Rolle der amino-terminale Bereich der α_1 -Untereinheit bei der Aktivierung der NOsGC spielt und es auch nach den vorliegenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden kann, dass das CPF-Motiv hierbei eine Rolle spielt.

Im letzten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der gemeinsamen Expression von HO und NOsGC im eukaryotischen Sf9-System auf die Aktivität und die Expression der NOsGC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von aktiven HO-Isoenzymen die Aktivierung der NOsGC durch NO reduziert. Untersuchungen mit dem NOsGC-Aktivator Cinaciguat in An- und Abwesenheit des NOsGC-Inhibitors ODQ lassen darauf schließen, dass die Koexpression der HO-Isoenzyme zu einer verminderten Hämhaltigkeit der NOsGC führt. Die verminderte NOsGC-Expression in Anwesenheit der HOs könnte ebenfalls ein Resultat der verminderten Häm Spiegel sein. Die Koexpression der hBVR schien durch die vermehrte Bildung des antioxidativ wirkenden Bilirubins hingegen einen protektiven Einfluss auf die Hämgruppe zu besitzen. Die Ergebnisse zeigen, dass im rekombinanten Expressionssystem eine Beeinflussung der NOsGC durch die HO-Formen und das hämabbauende System festzustellen ist.

Literaturverzeichnis

- ADACHI, M., TACHIBANA, K., ASAKURA, Y., YAMAMOTO, T., HANAKI, K. & OKA, A. 2004a. Compound heterozygous mutations of cytochrome P450 oxidoreductase gene (POR) in two patients with Antley-Bixler syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 128A, 333-9.
- ADACHI, T., ISHIKAWA, K., HIDA, W., MATSUMOTO, H., MASUDA, T., DATE, F., OGAWA, K., TAKEDA, K., FURUYAMA, K., ZHANG, Y., KITAMURO, T., OGAWA, H., MARUYAMA, Y. & SHIBAHARA, S. 2004b. Hypoxemia and blunted hypoxic ventilatory responses in mice lacking heme oxygenase-2. *Biochemical and biophysical research communications*, 320, 514-22.
- AHDAB-BARMADA, M. & MOOSSY, J. 1984. The neuropathology of kernicterus in the premature neonate: diagnostic problems. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 43, 45-56.
- ALDERTON, W. K., COOPER, C. E. & KNOWLES, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*, 357, 593-615.
- ARLT, W., WALKER, E. A., DRAPER, N., IVISON, H. E., RIDE, J. P., HAMMER, F., CHALDER, S. M., BORUCKA-MANKIEWICZ, M., HAUFFA, B. P., MALUNOWICZ, E. M., STEWART, P. M. & SHACKLETON, C. H. 2004. Congenital adrenal hyperplasia caused by mutant P450 oxidoreductase and human androgen synthesis: analytical study. *Lancet*, 363, 2128-35.
- AVOGARO, A., PAGNIN, E. & CALO, L. 2003. Monocyte NADPH oxidase subunit p22(phox) and inducible hemeoxygenase-1 gene expressions are increased in type II diabetic patients: relationship with oxidative stress. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88, 1753-9.
- AYUSO, P., MARTINEZ, C., LORENZO-BETANCOR, O., PASTOR, P., LUENGO, A., JIMENEZ-JIMENEZ, F. J., ALONSO-NAVARRO, H., VILLALBA, M. T., AGUNDEZ, J. A. & GARCIA-MARTIN, E. 2011. A polymorphism located at an ATG transcription start site of the heme oxygenase-2 gene is associated with classical Parkinson's disease. *Pharmacogenetics and genomics*, 21, 565-71.
- BARANANO, D. E., RAO, M., FERRIS, C. D. & SNYDER, S. H. 2002. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16093-8.
- BARONE, E., DI DOMENICO, F., CENINI, G., SULTANA, R., CINI, C., PREZIOSI, P., PERLUIGI, M., MANCUSO, C. & BUTTERFIELD, D. A. 2011a. Biliverdin reductase--a protein levels and activity in the brains of subjects with Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Biochimica et biophysica acta*, 1812, 480-7.
- BARONE, E., DI DOMENICO, F., CENINI, G., SULTANA, R., COCCIA, R., PREZIOSI, P., PERLUIGI, M., MANCUSO, C. & BUTTERFIELD, D. A. 2011b. Oxidative and nitrosative modifications of biliverdin reductase-A in the brain of subjects with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 25, 623-33.
- BARONE, E., TROMBINO, S., CASSANO, R., SGAMBATO, A., DE PAOLA, B., DI STASIO, E., PICCI, N., PREZIOSI, P. & MANCUSO, C. 2009.

- Characterization of the S-denitrosylating activity of bilirubin. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13, 2365-75.
- BAUER, I. & PANNEN, B. H. 2009. Bench-to-bedside review: Carbon monoxide--from mitochondrial poisoning to therapeutic use. *Critical care*, 13, 220.
- BECKER, E. M., ALONSO-ALIJA, C., APELER, H., GERZER, R., MINUTH, T., PLEISS, U., SCHMIDT, P., SCHRAMM, M., SCHRODER, H., SCHROEDER, W., STEINKE, W., STRAUB, A. & STASCH, J. P. 2001. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacology*, 1, 13.
- BEHREND, S., KAZMIERCZAK, B., STEENPA, A., KNAUF, B., BULLERDIEK, J., SCHOLZ, H. & EIBERG, H. 1999. Assignment of GUCY1B2, the gene coding for the beta2 subunit of human guanylyl cyclase to chromosomal band 13q14.3 between markers D13S168 and D13S155. *Genomics*, 55, 126-7.
- BEHREND, S. & VEHSE, K. 2000. The beta(2) subunit of soluble guanylyl cyclase contains a human-specific frameshift and is expressed in gastric carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 271, 64-9.
- BERRIDGE, M. V. & TAN, A. S. 1993. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 474-482.
- BIANCHETTI, C. M., YI, L., RAGSDALE, S. W. & PHILLIPS, G. N., JR. 2007. Comparison of apo- and heme-bound crystal structures of a truncated human heme oxygenase-2. *The Journal of biological chemistry*, 282, 37624-31.
- BIEL, M., ZONG, X., DISTLER, M., BOSSE, E., KLUGBAUER, N., MURAKAMI, M., FLOCKERZI, V. & HOFMANN, F. 1994. Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 3505-9.
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7, 1513-23.
- BOEHNING, D., MOON, C., SHARMA, S., HURT, K. J., HESTER, L. D., RONNETT, G. V., SHUGAR, D. & SNYDER, S. H. 2003. Carbon monoxide neurotransmission activated by CK2 phosphorylation of heme oxygenase-2. *Neuron*, 40, 129-37.
- BOEHNING, D., SEDAGHAT, L., SEDLAK, T. W. & SNYDER, S. H. 2004. Heme oxygenase-2 is activated by calcium-calmodulin. *The Journal of biological chemistry*, 279, 30927-30.
- BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B. & BEHR, J. P. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 7297-301.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-54.
- BRAGGINS, P. E., TRAKSHEL, G. M., KUTTY, R. K. & MAINES, M. D. 1986. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison

- with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochemical and biophysical research communications*, 141, 528-33.
- BROWN, G. C. & COOPER, C. E. 1994. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS letters*, 356, 295-8.
- BRUNE, B., SCHMIDT, K. U. & ULLRICH, V. 1990. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *European journal of biochemistry / FEBS*, 192, 683-8.
- BUDÄUS, L. H. 2002. *Untersuchung von Untereinheiten der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylyl-Cyclase nach Kopplung mit dem grün-fluoreszierenden Protein*. Dissertation, Universität Hamburg.
- BUDWORTH, J., MEILLERAIS, S., CHARLES, I. & POWELL, K. 1999. Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochemical and biophysical research communications*, 263, 696-701.
- BURNETT, A. L., JOHNS, D. G., KRIEGSFELD, L. J., KLEIN, S. L., CALVIN, D. C., DEMAS, G. E., SCHRAMM, L. P., TONEGAWA, S., NELSON, R. J., SNYDER, S. H. & POSS, K. D. 1998. Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. *Nature medicine*, 4, 84-7.
- BURTON, G. W., JOYCE, A. & INGOLD, K. U. 1983. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 221, 281-90.
- CAO, L., BLUTE, T. A. & ELDRED, W. D. 2000. Localization of heme oxygenase-2 and modulation of cGMP levels by carbon monoxide and/or nitric oxide in the retina. *Visual neuroscience*, 17, 319-29.
- CAO, L. & ELDRED, W. D. 2003. Inhibitors of nitric oxide synthase block carbon monoxide-induced increases in cGMP in retina. *Brain research*, 988, 78-83.
- CARBONELL, L. F., KLOWDEN, M. J. & MILLER, L. K. 1985. Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *Journal of virology*, 56, 153-60.
- CHAN, P. S. & LIN, M. C. 1974. Isolation of cyclic AMP by inorganic salt coprecipitation. *Methods in enzymology*, 38, 38-41.
- CHEN, Y. H., LIN, S. J., LIN, M. W., TSAI, H. L., KUO, S. S., CHEN, J. W., CHARNG, M. J., WU, T. C., CHEN, L. C., DING, Y. A., PAN, W. H., JOU, Y. S. & CHAU, L. Y. 2002a. Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Human genetics*, 111, 1-8.
- CHEN, Z., ZHANG, J. & STAMLER, J. S. 2002b. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8306-11.
- CHIKUBA, K., YUBISUI, T., SHIRABE, K. & TAKESHITA, M. 1994. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA of the human erythrocyte NADPH-flavin reductase. *Biochemical and biophysical research communications*, 198, 1170-6.
- CHUNG, S. W., LIU, X., MACIAS, A. A., BARON, R. M. & PERRELLA, M. A. 2008. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118, 239-47.
- CLEETER, M. W., COOPER, J. M., DARLEY-USMAR, V. M., MONCADA, S. & SCHAPIRA, A. H. 1994. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the

- terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS letters*, 345, 50-4.
- CLINICALTRIALS.GOV. U.S. National Institutes of Health. Available: www.clinicaltrials.gov [Accessed 2013-09-06].
- CORBIN, J. D., TURKO, I. V., BEASLEY, A. & FRANCIS, S. H. 2000. Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267, 2760-7.
- CRUSE, I. & MAINES, M. D. 1988. Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *The Journal of biological chemistry*, 263, 3348-53.
- DA SILVA, J. L., STOLTZ, R. A., DUNN, M. W., ABRAHAM, N. G. & SHIBAHARA, S. 1997. Diminished heme oxygenase-1 mRNA expression in RPE cells from diabetic donors as quantitated by competitive RT/PCR. *Current eye research*, 16, 380-6.
- DATLA, S. R., DUSTING, G. J., MORI, T. A., TAYLOR, C. J., CROFT, K. D. & JIANG, F. 2007. Induction of heme oxygenase-1 in vivo suppresses NADPH oxidase derived oxidative stress. *Hypertension*, 50, 636-42.
- DENNERY, P. A., MCDONAGH, A. F., SPITZ, D. R., RODGERS, P. A. & STEVENSON, D. K. 1995. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free radical biology & medicine*, 19, 395-404.
- DENNERY, P. A., SPITZ, D. R., YANG, G., TATAROV, A., LEE, C. S., SHEGOG, M. L. & POSS, K. D. 1998. Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2. *The Journal of clinical investigation*, 101, 1001-11.
- DENNINGER, J. W., SCHELVIS, J. P., BRANDISH, P. E., ZHAO, Y., BABCOCK, G. T. & MARLETTA, M. A. 2000. Interaction of soluble guanylate cyclase with YC-1: kinetic and resonance Raman studies. *Biochemistry*, 39, 4191-8.
- DERBYSHIRE, E. R. & MARLETTA, M. A. 2012. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. *Annual review of biochemistry*, 81, 533-59.
- DESMARD, M., DAVIDGE, K. S., BOUVET, O., MORIN, D., ROUX, D., FORESTI, R., RICARD, J. D., DENAMUR, E., POOLE, R. K., MONTRAVERS, P., MOTTERLINI, R. & BOCZKOWSKI, J. 2009. A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) exerts bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* and improves survival in an animal model of bacteraemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23, 1023-31.
- DING, S., YAO, D., DEENI, Y. Y., BURCHELL, B., WOLF, C. R. & FRIEDBERG, T. 2001. Human NADPH-P450 oxidoreductase modulates the level of cytochrome P450 CYP2D6 holoprotein via haem oxygenase-dependent and -independent pathways. *The Biochemical journal*, 356, 613-9.
- DING, Y., MCCOUBREY, W. K., JR. & MAINES, M. D. 1999. Interaction of heme oxygenase-2 with nitric oxide donors. Is the oxygenase an intracellular 'sink' for NO? *European journal of biochemistry / FEBS*, 264, 854-61.
- DING, Y., ZHANG, Y. Z., FURUYAMA, K., OGAWA, K., IGARASHI, K. & SHIBAHARA, S. 2006. Down-regulation of heme oxygenase-2 is associated

- with the increased expression of heme oxygenase-1 in human cell lines. *FEBS J*, 273, 5333-46.
- DORE, S., TAKAHASHI, M., FERRIS, C. D., ZAKHARY, R., HESTER, L. D., GUASTELLA, D. & SNYDER, S. H. 1999. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 2445-50.
- DOUGHERTY, R. M. 1964. Animal virus titration techniques. In: HARRIS, R. J. C. (ed.) *Techniques in Experimental Virology*. New York: Academic Press.
- EFENDIEV, R., CINELLI, A. R., LEIBIGER, I. B., BERTORELLO, A. M. & PEDEMONTE, C. H. 2006. FRET analysis reveals a critical conformational change within the Na,K-ATPase alpha1 subunit N-terminus during GPCR-dependent endocytosis. *FEBS letters*, 580, 5067-70.
- ELANGO VAN, M., WALLRABE, H., CHEN, Y., DAY, R. N., BARROSO, M. & PERIASAMY, A. 2003. Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Methods*, 29, 58-73.
- ENOCH, H. G. & STRITTMATTER, P. 1979. Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *The Journal of biological chemistry*, 254, 8976-81.
- EXNER, M., SCHILLINGER, M. & WAGNER, O. 2005. The Role of Heme Oxygenase-1 Promotor Polymorphisms in Human Disease. In: OTTERBEIN, L. E. & ZUCKERBRAUN, B. S. (eds.) *Heme oxygenase : the elegant orchestration of its products in medicine*. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers.
- FLUCK, C. E., PANDEY, A. V., HUANG, N., AGRAWAL, V. & MILLER, W. L. 2008. P450 oxidoreductase deficiency - a new form of congenital adrenal hyperplasia. *Endocrine development*, 13, 67-81.
- FLUCK, C. E., TAJIMA, T., PANDEY, A. V., ARLT, W., OKUHARA, K., VERGE, C. F., JABS, E. W., MENDONCA, B. B., FUJIEDA, K. & MILLER, W. L. 2004. Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nature genetics*, 36, 228-30.
- FÖRSTER, T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437, 55-75.
- FRIEBE, A. & KOESLING, D. 1998. Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. *Molecular pharmacology*, 53, 123-7.
- FRIEBE, A., MULLERSHAUSEN, F., SMOLENSKI, A., WALTER, U., SCHULTZ, G. & KOESLING, D. 1998. YC-1 potentiates nitric oxide- and carbon monoxide-induced cyclic GMP effects in human platelets. *Molecular pharmacology*, 54, 962-7.
- FRIEBE, A., SCHULTZ, G. & KOESLING, D. 1996. Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *EMBO J*, 15, 6863-8.
- FRITZ, B. G., HU, X., BRAILEY, J. L., BERRY, R. E., WALKER, F. A. & MONTFORT, W. R. 2011. Oxidation and loss of heme in soluble guanylyl cyclase from *Manduca sexta*. *Biochemistry*, 50, 5813-5.
- FURCHGOTT, R. F. & ZAWADZKI, J. V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-6.
- GARTHWAITE, J., SOUTHAM, E., BOULTON, C. L., NIELSEN, E. B., SCHMIDT, K. & MAYER, B. 1995. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive

- guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Molecular pharmacology*, 48, 184-8.
- GEORGE, W. J., POLSON, J. B., O'TOOLE, A. G. & GOLDBERG, N. D. 1970. Elevation of guanosine 3',5'-cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 66, 398-403.
- GERRITSEN, H. C., ASSELBERGS, M. A., AGRONSKAIA, A. V. & VAN SARK, W. G. 2002. Fluorescence lifetime imaging in scanning microscopes: acquisition speed, photon economy and lifetime resolution. *Journal of microscopy*, 206, 218-24.
- GERZER, R., BOHME, E., HOFMANN, F. & SCHULTZ, G. 1981. Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS letters*, 132, 71-4.
- GIBBS, P. E. & MAINES, M. D. 2007. Biliverdin inhibits activation of NF-kappaB: reversal of inhibition by human biliverdin reductase. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 121, 2567-74.
- GIULI, G., SCHOLL, U., BULLE, F. & GUELLAEN, G. 1992. Molecular cloning of the cDNAs coding for the two subunits of soluble guanylyl cyclase from human brain. *FEBS letters*, 304, 83-8.
- GOMES, A. M., WINTER, S., KLEIN, K., TURPEINEN, M., SCHAEFFELER, E., SCHWAB, M. & ZANGER, U. M. 2009. Pharmacogenomics of human liver cytochrome P450 oxidoreductase: multifactorial analysis and impact on microsomal drug oxidation. *Pharmacogenomics*, 10, 579-99.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- GRAILHE, R., MEROLA, F., RIDARD, J., COUVIGNOU, S., LE POUPON, C., CHANGEUX, J. P. & LAGUITTON-PASQUIER, H. 2006. Monitoring protein interactions in the living cell through the fluorescence decays of the cyan fluorescent protein. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 7, 1442-54.
- GRUBINA, R., HUANG, Z., SHIVA, S., JOSHI, M. S., AZAROV, I., BASU, S., RINGWOOD, L. A., JIANG, A., HOGG, N., KIM-SHAPIO, D. B. & GLADWIN, M. T. 2007. Concerted nitric oxide formation and release from the simultaneous reactions of nitrite with deoxy- and oxyhemoglobin. *The Journal of biological chemistry*, 282, 12916-27.
- GUTSCHER, M., PAULEAU, A. L., MARTY, L., BRACH, T., WABNITZ, G. H., SAMSTAG, Y., MEYER, A. J. & DICK, T. P. 2008. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods*, 5, 553-9.
- HAASE, N., HAASE, T., KRAEHLING, J. R. & BEHRENDTS, S. 2010a. Direct fusion of subunits of heterodimeric nitric oxide sensitive guanylyl cyclase leads to functional enzymes with preserved biochemical properties: evidence for isoform specific activation by ciguates. *Biochemical pharmacology*, 80, 1676-83.
- HAASE, N., HAASE, T., SEEANNER, M. & BEHRENDTS, S. 2010b. Nitric oxide sensitive guanylyl cyclase activity decreases during cerebral postnatal development because of a reduction in heterodimerization. *Journal of neurochemistry*, 112, 542-51.

- HAASE, T., HAASE, N., KRAEHLING, J. R. & BEHREND, S. 2010c. Fluorescent fusion proteins of soluble guanylyl cyclase indicate proximity of the heme nitric oxide domain and catalytic domain. *PLoS one*, 5, e11617.
- HALL, C. N. & GARTHWAITE, J. 2009. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 21, 92-103.
- HANSEN, M. C., PALMER, R. J., JR., UDSEN, C., WHITE, D. C. & MOLIN, S. 2001. Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. *Microbiology*, 147, 1383-91.
- HANSON, G. T., AGGELER, R., OGLESBEE, D., CANNON, M., CAPALDI, R. A., TSIEN, R. Y. & REMINGTON, S. J. 2004. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *The Journal of biological chemistry*, 279, 13044-53.
- HARDMAN, J. G. & SUTHERLAND, E. W. 1969. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *The Journal of biological chemistry*, 244, 6363-70.
- HAYASHI, S., OMATA, Y., SAKAMOTO, H., HIGASHIMOTO, Y., HARA, T., SAGARA, Y. & NOGUCHI, M. 2004. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene*, 336, 241-50.
- HIGASHIMOTO, Y., SUGISHIMA, M., SATO, H., SAKAMOTO, H., FUKUYAMA, K., PALMER, G. & NOGUCHI, M. 2008. Mass spectrometric identification of lysine residues of heme oxygenase-1 that are involved in its interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemical and biophysical research communications*, 367, 852-8.
- HIRAI, H., KUBO, H., YAMAYA, M., NAKAYAMA, K., NUMASAKI, M., KOBAYASHI, S., SUZUKI, S., SHIBAHARA, S. & SASAKI, H. 2003. Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood*, 102, 1619-21.
- HOFFMANN, L. S., SCHMIDT, P. M., KEIM, Y., SCHAEFER, S., SCHMIDT, H. H. & STASCH, J. P. 2009. Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *British journal of pharmacology*, 157, 781-95.
- HOPKINS, P. N., WU, L. L., HUNT, S. C., JAMES, B. C., VINCENT, G. M. & WILLIAMS, R. R. 1996. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 16, 250-5.
- HORI, R., KASHIBA, M., TOMA, T., YACHIE, A., GODA, N., MAKINO, N., SOEJIMA, A., NAGASAWA, T., NAKABAYASHI, K. & SUEMATSU, M. 2002. Gene transfection of H25A mutant heme oxygenase-1 protects cells against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry*, 277, 10712-8.
- HUANG, N., AGRAWAL, V., GIACOMINI, K. M. & MILLER, W. L. 2008. Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 1733-8.

- HUANG, T. J., MCCOUBREY, W. K., JR. & MAINES, M. D. 2001. Heme oxygenase-2 interaction with metalloporphyrins: function of heme regulatory motifs. *Antioxidants & redox signaling*, 3, 685-96.
- HUBER, W. J., 3RD & BACKES, W. L. 2007. Expression and characterization of full-length human heme oxygenase-1: the presence of intact membrane-binding region leads to increased binding affinity for NADPH cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, 46, 12212-9.
- HUBER, W. J., 3RD, SCRUGGS, B. A. & BACKES, W. L. 2009. C-Terminal membrane spanning region of human heme oxygenase-1 mediates a time-dependent complex formation with cytochrome P450 reductase. *Biochemistry*, 48, 190-7.
- HUGHES, P. R. & WOOD, H. A. 1986. In vivo and in vitro bioassay methods for baculoviruses. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. (eds.) *The Biology of Baculoviruses*. Boca Raton: CRC Press.
- HURLEY, J. H. 1998. The adenylyl and guanylyl cyclase superfamily. *Current opinion in structural biology*, 8, 770-7.
- HWANG, H. W., LEE, J. R., CHOU, K. Y., SUEN, C. S., HWANG, M. J., CHEN, C., SHIEH, R. C. & CHAU, L. Y. 2009. Oligomerization is crucial for the stability and function of heme oxygenase-1 in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 284, 22672-9.
- IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E. & CHAUDHURI, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 9265-9.
- IGNARRO, L. J., WOOD, K. S. & WOLIN, M. S. 1982. Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 2870-3.
- IMAI, T., MORITA, T., SHINDO, T., NAGAI, R., YAZAKI, Y., KURIHARA, H., SUEMATSU, M. & KATAYAMA, S. 2001. Vascular smooth muscle cell-directed overexpression of heme oxygenase-1 elevates blood pressure through attenuation of nitric oxide-induced vasodilation in mice. *Circulation research*, 89, 55-62.
- INGI, T., CHENG, J. & RONNETT, G. V. 1996. Carbon monoxide: an endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron*, 16, 835-42.
- ISHIKAWA, E., ISHIKAWA, S., DAVIS, J. W. & SUTHERLAND, E. W. 1969. Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanylyl cyclase in rat intestine. *The Journal of biological chemistry*, 244, 6371-6.
- ISHIKAWA, H., KATO, M., HORI, H., ISHIMORI, K., KIRISAKO, T., TOKUNAGA, F. & IWAI, K. 2005. Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of IRP2. *Molecular cell*, 19, 171-81.
- ISHIKAWA, K., MATERA, K. M., ZHOU, H., FUJII, H., SATO, M., YOSHIMURA, T., IKEDA-SAITO, M. & YOSHIDA, T. 1998. Identification of histidine 45 as the axial heme iron ligand of heme oxygenase-2. *The Journal of biological chemistry*, 273, 4317-22.
- ISHIKAWA, K., SATO, M., ITO, M. & YOSHIDA, T. 1992. Importance of histidine residue 25 of rat heme oxygenase for its catalytic activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 182, 981-6.

- ISHIKAWA, K., SATO, M. & YOSHIDA, T. 1991. Expression of rat heme oxygenase in *Escherichia coli* as a catalytically active, full-length form that binds to bacterial membranes. *European journal of biochemistry / FEBS*, 202, 161-5.
- ISHIKAWA, K., TAKEUCHI, N., TAKAHASHI, S., MATERA, K. M., SATO, M., SHIBAHARA, S., ROUSSEAU, D. L., IKEDA-SAITO, M. & YOSHIDA, T. 1995. Heme oxygenase-2. Properties of the heme complex of the purified tryptic fragment of recombinant human heme oxygenase-2. *The Journal of biological chemistry*, 270, 6345-50.
- ITO-MAKI, M., ISHIKAWA, K., MATERA, K. M., SATO, M., IKEDA-SAITO, M. & YOSHIDA, T. 1995. Demonstration that histidine 25, but not 132, is the axial heme ligand in rat heme oxygenase-1. *Archives of biochemistry and biophysics*, 317, 253-8.
- IYANAGI, T., MAKINO, N. & MASON, H. S. 1974. Redox properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductases. *Biochemistry*, 13, 1701-10.
- IYANAGI, T. & MASON, H. S. 1973. Some properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase. *Biochemistry*, 12, 2297-308.
- IYER, L. M., ANANTHARAMAN, V. & ARAVIND, L. 2003. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC genomics*, 4, 5.
- JAGGAR, J. H., LI, A., PARFENOVA, H., LIU, J., UMSTOT, E. S., DOPICO, A. M. & LEFFLER, C. W. 2005. Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Circulation research*, 97, 805-12.
- JAKOBS, K. H., BÖHME, E. & SCHULTZ, G. 1976. Determination of Cyclic GMP in Biological Material. In: DUMONT, J. E., BROWN, B. L. & MARSHALL, N. J. (eds.) *Eukaryotic cell function and growth: regulation by intracellular cyclic nucleotides*. Plenum Press.
- JAMES, J. R., OLIVEIRA, M. I., CARMO, A. M., IABONI, A. & DAVIS, S. J. 2006. A rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nature methods*, 3, 1001-6.
- JONES, A. W., DURANTE, W. & KORTHUIS, R. J. 2010. Heme oxygenase-1 deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 335, 85-91.
- JONES, D. P. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 8, 1865-79.
- JUCKETT, M., ZHENG, Y., YUAN, H., PASTOR, T., ANTHOLINE, W., WEBER, M. & VERCELLOTTI, G. 1998. Heme and the endothelium. Effects of nitric oxide on catalytic iron and heme degradation by heme oxygenase. *The Journal of biological chemistry*, 273, 23388-97.
- KANG, D., GHOSH, Y. S., SUH, M. & KANG, C. 2002. Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23, 1511-1512.
- KAROW, D. S., PAN, D., DAVIS, J. H., BEHRENDT, S., MATHIES, R. A. & MARLETTA, M. A. 2005. Characterization of functional heme domains from soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*, 44, 16266-74.

- KENNEDY, M. B. 1995. Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends in biochemical sciences*, 20, 350.
- KEYSE, S. M. & TYRRELL, R. M. 1987. Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 262, 14821-5.
- KEYSE, S. M. & TYRRELL, R. M. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 99-103.
- KHARITONOV, V. G., SHARMA, V. S., PILZ, R. B., MAGDE, D. & KOESLING, D. 1995. Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 2568-71.
- KIM, H. P., WANG, X., NAKAO, A., KIM, S. I., MURASE, N., CHOI, M. E., RYTER, S. W. & CHOI, A. M. 2005a. Caveolin-1 expression by means of p38beta mitogen-activated protein kinase mediates the antiproliferative effect of carbon monoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 11319-24.
- KIM, H. P., WANG, X., ZHANG, J., SUH, G. Y., BENJAMIN, I. J., RYTER, S. W. & CHOI, A. M. 2005b. Heat shock protein-70 mediates the cytoprotective effect of carbon monoxide: involvement of p38 beta MAPK and heat shock factor-1. *Journal of immunology*, 175, 2622-9.
- KIM, H. S., LOUGHRAN, P. A., RAO, J., BILLIAR, T. R. & ZUCKERBRAUN, B. S. 2008. Carbon monoxide activates NF-kappaB via ROS generation and Akt pathways to protect against cell death of hepatocytes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 295, G146-G152.
- KIM, Y. S., ZHUANG, H., KOEHLER, R. C. & DORE, S. 2005c. Distinct protective mechanisms of HO-1 and HO-2 against hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*, 38, 85-92.
- KIMPARA, T., TAKEDA, A., WATANABE, K., ITOYAMA, Y., IKAWA, S., WATANABE, M., ARAI, H., SASAKI, H., HIGUCHI, S., OKITA, N., TAKASE, S., SAITO, H., TAKAHASHI, K. & SHIBAHARA, S. 1997. Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. *Human genetics*, 100, 145-7.
- KIMURA, H. & MURAD, F. 1974a. Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *The Journal of biological chemistry*, 249, 6910-6.
- KIMURA, H. & MURAD, F. 1974b. Nonenzymatic formation of guanosine 3':5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *The Journal of biological chemistry*, 249, 329-31.
- KIMURA, H. & MURAD, F. 1975. Two forms of guanylate cyclase in mammalian tissues and possible mechanisms for their regulation. *Metabolism: clinical and experimental*, 24, 439-45.
- KITAMURO, T., TAKAHASHI, K., OGAWA, K., UDONO-FUJIMORI, R., TAKEDA, K., FURUYAMA, K., NAKAYAMA, M., SUN, J., FUJITA, H., HIDA, W., HATTORI, T., SHIRATO, K., IGARASHI, K. & SHIBAHARA, S. 2003. Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *The Journal of biological chemistry*, 278, 9125-33.

- KITTS, P. A. & POSSEE, R. D. 1993. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques*, 14, 810-7.
- KLINGENBERG, M. 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75, 376-86.
- KO, F. N., WU, C. C., KUO, S. C., LEE, F. Y. & TENG, C. M. 1994. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood*, 84, 4226-33.
- KOGLIN, M. & BEHREND, S. 2000. Cloning and functional expression of the rat $\alpha(2)$ subunit of soluble guanylyl cyclase. *Biochimica et biophysica acta*, 1494, 286-9.
- KOGLIN, M. & BEHREND, S. 2002. Biliverdin IX is an endogenous inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Biochemical pharmacology*, 64, 109-16.
- KOGLIN, M. & BEHREND, S. 2003. A functional domain of the $\alpha(1)$ subunit of soluble guanylyl cyclase is necessary for activation of the enzyme by nitric oxide and YC-1 but is not involved in heme binding. *The Journal of biological chemistry*, 278, 12590-7.
- KOGLIN, M., STASCH, J. P. & BEHREND, S. 2002. BAY 41-2272 activates two isoforms of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Biochemical and biophysical research communications*, 292, 1057-62.
- KOGLIN, M., VEHSE, K., BUDAUEUS, L., SCHOLZ, H. & BEHREND, S. 2001. Nitric oxide activates the $\beta(2)$ subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *The Journal of biological chemistry*, 276, 30737-43.
- KOMURO, A., TOBE, T., HASHIMOTO, K., NAKANO, Y., YAMAGUCHI, T., NAKAJIMA, H. & TOMITA, M. 1996a. Molecular cloning and expression of human liver biliverdin-IX β reductase. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 19, 796-804.
- KOMURO, A., TOBE, T., NAKANO, Y., YAMAGUCHI, T. & TOMITA, M. 1996b. Cloning and characterization of the cDNA encoding human biliverdin-IX α reductase. *Biochimica et biophysica acta*, 1309, 89-99.
- KONTERMANN, R. & DÜBEL, S. 2010. *Antibody Engineering*, Springer.
- KORNDORFER, I. P. & SKERRA, A. 2002. Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 11, 883-93.
- KRAEHLING, J. R., BUSKER, M., HAASE, T., HAASE, N., KOGLIN, M., LINNENBAUM, M. & BEHREND, S. 2011. The Amino-Terminus of Nitric Oxide Sensitive Guanylyl Cyclase $\alpha(1)$ Does Not Affect Dimerization but Influences Subcellular Localization. *PLoS one*, 6, e25772.
- KUHL, T., SAHOO, N., NIKOLAJSKI, M., SCHLOTT, B., HEINEMANN, S. H. & IMHOF, D. 2011. Determination of heme-binding characteristics of proteins by a combinatorial peptide library approach. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 12, 2846-55.
- KUHL, T., WISSBROCK, A., GORADIA, N., SAHOO, N., GALLER, K., NEUGEBAUER, U., POPP, J., HEINEMANN, S. H., OHLENSCHLAGER, O. & IMHOF, D. 2013. Analysis of Fe(III) Heme Binding to Cysteine-Containing Heme-Regulatory Motifs in Proteins. *ACS chemical biology*, 8, 1785-93.
- KUTTY, R. K., KUTTY, G., RODRIGUEZ, I. R., CHADER, G. J. & WIGGERT, B. 1994. Chromosomal localization of the human heme oxygenase genes: heme

- oxygenase-1 (HMOX1) maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 (HMOX2) maps to chromosome 16p13.3. *Genomics*, 20, 513-6.
- KUTTY, R. K. & MAINES, M. D. 1981. Purification and characterization of biliverdin reductase from rat liver. *The Journal of biological chemistry*, 256, 3956-62.
- KYHSE-ANDERSEN, J. 1984. Electrophoretic transfer from multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins to nitrocellulose membranes. *J Biochem Biophys Methods*, 10, 203-209.
- LAD, L., SCHULLER, D. J., SHIMIZU, H., FRIEDMAN, J., LI, H., ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. & POULOS, T. L. 2003. Comparison of the heme-free and -bound crystal structures of human heme oxygenase-1. *The Journal of biological chemistry*, 278, 7834-43.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LATHROP, J. T. & TIMKO, M. P. 1993. Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science*, 259, 522-5.
- LE, W. D., XIE, W. J. & APPEL, S. H. 1999. Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury. *Journal of neuroscience research*, 56, 652-8.
- LEMBERG, R. & WYNDHAM, R. A. 1936. Reduction of biliverdin to bilirubin in tissues. *The Biochemical journal*, 30, 1147-70.
- LERNER-MARMAROSH, N., SHEN, J., TORNO, M. D., KRAVETS, A., HU, Z. & MAINES, M. D. 2005. Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 7109-14.
- LIN, Q., WEIS, S., YANG, G., WENG, Y. H., HELSTON, R., RISH, K., SMITH, A., BORDNER, J., POLTE, T., GAUNITZ, F. & DENNERY, P. A. 2007. Heme oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress. *J Biol Chem*, 282, 20621-33.
- LIN, Q. S., WEIS, S., YANG, G., ZHUANG, T., ABATE, A. & DENNERY, P. A. 2008. Catalytic inactive heme oxygenase-1 protein regulates its own expression in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 44, 847-55.
- LINDL, T. & BAUER, J. 1994. *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*, Fischer.
- LIU, Y., RUOHO, A. E., RAO, V. D. & HURLEY, J. H. 1997. Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 13414-9.
- LOPEZ-BARNEO, J., LOPEZ-LOPEZ, J. R., URENA, J. & GONZALEZ, C. 1988. Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science*, 241, 580-2.
- LU, A. Y. & COON, M. J. 1968. Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *The Journal of biological chemistry*, 243, 1331-2.
- LUCKOW, V. A., LEE, S. C., BARRY, G. F. & OLINS, P. O. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of virology*, 67, 4566-79.

- LUNDBERG, J. O., WEITZBERG, E. & GLADWIN, M. T. 2008. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 7, 156-67.
- MA, X., SAYED, N., BASKARAN, P., BEUVE, A. & VAN DEN AKKER, F. 2008. PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase domain crystal structure. *The Journal of biological chemistry*, 283, 1167-78.
- MAINES, M. D., EWING, J. F., HUANG, T. J. & PANAHIAN, N. 2001. Nuclear localization of biliverdin reductase in the rat kidney: response to nephrotoxins that induce heme oxygenase-1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 296, 1091-7.
- MAINES, M. D. & KAPPAS, A. 1974. Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 4293-7.
- MAINES, M. D., TRAKSHEL, G. M. & KUTTY, R. K. 1986. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *The Journal of biological chemistry*, 261, 411-9.
- MANCUSO, C., BONSIGNORE, A., DI STASIO, E., MORDENTE, A. & MOTTERLINI, R. 2003. Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. *Biochemical pharmacology*, 66, 2355-63.
- MARKS, G. S., BRIEN, J. F., NAKATSU, K. & MCLAUGHLIN, B. E. 1991. Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends in pharmacological sciences*, 12, 185-8.
- MAROHNIC, C. C., HUBER III, W. J., PATRICK CONNICK, J., REED, J. R., MCCAMMON, K., PANDA, S. P., MARTASEK, P., BACKES, W. L. & MASTERS, B. S. 2011. Mutations of human cytochrome P450 reductase differentially modulate heme oxygenase-1 activity and oligomerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 513, 42-50.
- MARTIN, F., BASKARAN, P., MA, X., DUNTEN, P. W., SCHAEFER, M., STASCH, J. P., BEUVE, A. & VAN DEN AKKER, F. 2010. Structure of cinaciguat (BAY 58-2667) bound to Nostoc H-NOX domain reveals insights into heme-mimetic activation of the soluble guanylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry*, 285, 22651-7.
- MCCOUBREY, W. K., JR., HUANG, T. J. & MAINES, M. D. 1997a. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *The Journal of biological chemistry*, 272, 12568-74.
- MCCOUBREY, W. K., JR., HUANG, T. J. & MAINES, M. D. 1997b. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *European journal of biochemistry / FEBS*, 247, 725-32.
- MEURER, S., PIOCH, S., PABST, T., OPITZ, N., SCHMIDT, P. M., BECKHAUS, T., WAGNER, K., MATT, S., GEGENBAUER, K., GESCHKA, S., KARAS, M., STASCH, J. P., SCHMIDT, H. H. & MULLER-ESTERL, W. 2009. Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from proteasomal degradation. *Circulation research*, 105, 33-41.

- MILLER, M. R. & MEGSON, I. L. 2007. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *British journal of pharmacology*, 151, 305-21.
- MILLER, W. L., AGRAWAL, V., SANDEE, D., TEE, M. K., HUANG, N., CHOI, J. H., MORRISSEY, K. & GIACOMINI, K. M. 2011. Consequences of POR mutations and polymorphisms. *Molecular and cellular endocrinology*, 336, 174-9.
- MITTENDORF, J., WEIGAND, S., ALONSO-ALIJA, C., BISCHOFF, E., FEURER, A., GERISCH, M., KERN, A., KNORR, A., LANG, D., MUENTER, K., RADTKE, M., SCHIROK, H., SCHLEMMER, K. H., STAHL, E., STRAUB, A., WUNDER, F. & STASCH, J. P. 2009. Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension. *ChemMedChem*, 4, 853-65.
- MOGLICH, A., AYERS, R. A. & MOFFAT, K. 2009. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure*, 17, 1282-94.
- MORLEY, D., MARAGOS, C. M., ZHANG, X. Y., BOIGNON, M., WINK, D. A. & KEEFER, L. K. 1993. Mechanism of vascular relaxation induced by the nitric oxide (NO)/nucleophile complexes, a new class of NO-based vasodilators. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 21, 670-6.
- MOTTERLINI, R., CLARK, J. E., FORESTI, R., SARATHCHANDRA, P., MANN, B. E. & GREEN, C. J. 2002. Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circulation research*, 90, E17-24.
- MOTTERLINI, R., HAAS, B. & FORESTI, R. 2012. Emerging concepts on the anti-inflammatory actions of carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs). *Medical gas research*, 2, 28.
- MOTTERLINI, R. & OTTERBEIN, L. E. 2010. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nature reviews. Drug discovery*, 9, 728-43.
- MOTTERLINI, R., SAWLE, P., HAMMAD, J., BAINS, S., ALBERTO, R., FORESTI, R. & GREEN, C. J. 2005. CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19, 284-6.
- MULSCH, A., BAUERSACHS, J., SCHAFER, A., STASCH, J. P., KAST, R. & BUSSE, R. 1997. Effect of YC-1, an NO-independent, superoxide-sensitive stimulator of soluble guanylyl cyclase, on smooth muscle responsiveness to nitrovasodilators. *British journal of pharmacology*, 120, 681-9.
- MUNAKATA, H., SUN, J. Y., YOSHIDA, K., NAKATANI, T., HONDA, E., HAYAKAWA, S., FURUYAMA, K. & HAYASHI, N. 2004. Role of the heme regulatory motif in the heme-mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinate synthase. *Journal of biochemistry*, 136, 233-8.
- MURRELL, W. 1879. Nitro-glycerine as a remedy for angina pectoris. *The Lancet*, 113, 80-81.
- NDISANG, J. F., ZHAO, W. & WANG, R. 2002. Selective regulation of blood pressure by heme oxygenase-1 in hypertension. *Hypertension*, 40, 315-21.
- NEW ENGLAND BIOLABS. Available: <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder> [Accessed].
- NIESEL, J., PINTO, A., PEINDY N'DONGO, H. W., MERZ, K., OTT, I., GUST, R. & SCHATZSCHNEIDER, U. 2008. Photoinduced CO release, cellular uptake and

cytotoxicity of a tris(pyrazolyl)methane (tpm) manganese tricarbonyl complex. *Chemical communications*, 1798-800.

NOBELPRIZE.ORG.

Available:

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/ [Accessed 2013-07-09].

- OBERLE, S., ABATE, A., GROSSER, N., HEMMERLE, A., VREMAN, H. J., DENNERY, P. A., SCHNEIDER, H. T., STALLEICKEN, D. & SCHRODER, H. 2003. Endothelial protection by pentaerythritol trinitrate: bilirubin and carbon monoxide as possible mediators. *Experimental biology and medicine*, 228, 529-34.
- OGAWA, K., SUN, J., TAKETANI, S., NAKAJIMA, O., NISHITANI, C., SASSA, S., HAYASHI, N., YAMAMOTO, M., SHIBAHARA, S., FUJITA, H. & IGARASHI, K. 2001. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *The EMBO journal*, 20, 2835-43.
- OHTA, K., YACHIE, A., FUJIMOTO, K., KANEDA, H., WADA, T., TOMA, T., SENO, A., KASAHARA, Y., YOKOYAMA, H., SEKI, H. & KOIZUMI, S. 2000. Tubular injury as a cardinal pathologic feature in human heme oxygenase-1 deficiency. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 35, 863-70.
- OIDA, T., SAKO, Y. & KUSUMI, A. 1993. Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy). Methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells. *Biophysical journal*, 64, 676-85.
- OKINAGA, S., TAKAHASHI, K., TAKEDA, K., YOSHIKAWA, M., FUJITA, H., SASAKI, H. & SHIBAHARA, S. 1996. Regulation of human heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress. *Blood*, 87, 5074-84.
- OLLINGER, R., YAMASHITA, K., BILBAN, M., ERAT, A., KOGLER, P., THOMAS, M., CSIZMADIA, E., USHEVA, A., MARGREITER, R. & BACH, F. H. 2007. Bilirubin and biliverdin treatment of atherosclerotic diseases. *Cell cycle*, 6, 39-43.
- OMORI, K. & KOTERA, J. 2007. Overview of PDEs and their regulation. *Circulation research*, 100, 309-27.
- ONO, K., MANNAMI, T. & IWAI, N. 2003. Association of a promoter variant of the haeme oxygenase-1 gene with hypertension in women. *Journal of hypertension*, 21, 1497-503.
- ONO, T. & BLOCH, K. 1975. Solubilization and partial characterization of rat liver squalene epoxidase. *The Journal of biological chemistry*, 250, 1571-9.
- ORTEGA-SAENZ, P., PASCUAL, A., GOMEZ-DIAZ, R. & LOPEZ-BARNEO, J. 2006. Acute oxygen sensing in heme oxygenase-2 null mice. *The Journal of general physiology*, 128, 405-11.
- OTTERBEIN, L. E., BACH, F. H., ALAM, J., SOARES, M., TAO LU, H., WYSK, M., DAVIS, R. J., FLAVELL, R. A. & CHOI, A. M. 2000. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature medicine*, 6, 422-8.
- OTTERBEIN, L. E., MANTELL, L. L. & CHOI, A. M. 1999. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *The American journal of physiology*, 276, L688-94.

- PADAYATTY, S. J., KATZ, A., WANG, Y., ECK, P., KWON, O., LEE, J. H., CHEN, S., CORPE, C., DUTTA, A., DUTTA, S. K. & LEVINE, M. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22, 18-35.
- PALMER, R. M., FERRIGE, A. G. & MONCADA, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-6.
- PALMER, R. M. & MONCADA, S. 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 158, 348-52.
- PAMPLONA, A., FERREIRA, A., BALLA, J., JENEY, V., BALLA, G., EPIPHANIO, S., CHORA, A., RODRIGUES, C. D., GREGOIRE, I. P., CUNHA-RODRIGUES, M., PORTUGAL, S., SOARES, M. P. & MOTA, M. M. 2007. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nature medicine*, 13, 703-10.
- PANDEY, A. V., FLUCK, C. E. & MULLIS, P. E. 2010. Altered heme catabolism by heme oxygenase-1 caused by mutations in human NADPH cytochrome P450 reductase. *Biochemical and biophysical research communications*, 400, 374-8.
- PEERS, C. 1990. Hypoxic suppression of K⁺ currents in type I carotid body cells: selective effect on the Ca²⁺(+)-activated K⁺ current. *Neuroscience letters*, 119, 253-6.
- PFEIFER, A., KLATT, P., MASSBERG, S., NY, L., SAUSBIER, M., HIRNEISS, C., WANG, G. X., KORTH, M., ASZODI, A., ANDERSSON, K. E., KROMBACH, F., MAYERHOFER, A., RUTH, P., FASSLER, R. & HOFMANN, F. 1998. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO journal*, 17, 3045-51.
- PIANTADOSI, C. A. 2002. Carbon monoxide poisoning. *The New England journal of medicine*, 347, 1054-5.
- PONKA, P., BEAUMONT, C. & RICHARDSON, D. R. 1998. Function and regulation of transferrin and ferritin. *Seminars in hematology*, 35, 35-54.
- POSS, K. D., THOMAS, M. J., EBRALIDZE, A. K., O'DELL, T. J. & TONEGAWA, S. 1995. Hippocampal long-term potentiation is normal in heme oxygenase-2 mutant mice. *Neuron*, 15, 867-73.
- POSS, K. D. & TONEGAWA, S. 1997a. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10919-24.
- POSS, K. D. & TONEGAWA, S. 1997b. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10925-30.
- PRASHER, D. C., ECKENRODE, V. K., WARD, W. W., PRENDERGAST, F. G. & CORMIER, M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111, 229-33.
- RAPOPORT, R. M., DRAZNIN, M. B. & MURAD, F. 1983. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*, 306, 174-6.
- RAPOPORT, R. M. & MURAD, F. 1983. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *Journal of cyclic nucleotide and protein phosphorylation research*, 9, 281-96.

- REED, J. R., CAWLEY, G. F. & BACKES, W. L. 2011. Inhibition of cytochrome P450 1A2-mediated metabolism and production of reactive oxygen species by heme oxygenase-1 in rat liver microsomes. *Drug metabolism letters*, 5, 6-16.
- REED, L. J. & MUENCH, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, 3, 493-497.
- RODKEY, F. L., O'NEAL, J. D., COLLISON, H. A. & UDDIN, D. E. 1974. Relative affinity of hemoglobin S and hemoglobin A for carbon monoxide and oxygen. *Clinical chemistry*, 20, 83-4.
- ROTHKEGEL, C., SCHMIDT, P. M., ATKINS, D. J., HOFFMANN, L. S., SCHMIDT, H. H., SCHRODER, H. & STASCH, J. P. 2007. Dimerization region of soluble guanylate cyclase characterized by bimolecular fluorescence complementation in vivo. *Molecular pharmacology*, 72, 1181-90.
- RUSSWURM, M., WITTAU, N. & KOESLING, D. 2001. Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive $\alpha_2\beta_1$ guanylyl cyclase to synaptic membranes. *The Journal of biological chemistry*, 276, 44647-52.
- SAHNOUN, Z., JAMOUCSI, K. & ZEGHAL, K. M. 1997. [Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects]. *Therapie*, 52, 251-70.
- SALIM, M., BROWN-KIPPHUT, B. A. & MAINES, M. D. 2001. Human biliverdin reductase is autophosphorylated, and phosphorylation is required for bilirubin formation. *The Journal of biological chemistry*, 276, 10929-34.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SASSA, S. 2004. Why heme needs to be degraded to iron, biliverdin IX α , and carbon monoxide? *Antioxidants & redox signaling*, 6, 819-24.
- SCHACTER, B. A., NELSON, E. B., MARVER, H. S. & MASTERS, B. S. 1972. Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *The Journal of biological chemistry*, 247, 3601-7.
- SCHMIDT, H. H., SCHMIDT, P. M. & STASCH, J. P. 2009. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handbook of experimental pharmacology*, 309-39.
- SCHMIDT, T. G. & SKERRA, A. 1994. One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *Journal of chromatography. A*, 676, 337-45.
- SCHMIDT, T. G. & SKERRA, A. 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature protocols*, 2, 1528-35.
- SCHRAMMEL, A., BEHREND, S., SCHMIDT, K., KOESLING, D. & MAYER, B. 1996. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Molecular pharmacology*, 50, 1-5.
- SCHULTZ, G. & BÖHME, E. 1984. GTP pyrophosphate-lyase (cyclizing), EC 4.6.1.2. In: BERGMAYER, H. U., BERGMAYER, J. & GRASSEL, M. (eds.) *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed.: Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- SCHULTZ, G., BOHME, E. & MUNSKE, K. 1969. Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life sciences*, 8, 1323-32.

- SCHULTZ, G., HARDMAN, J. G., SCHULTZ, K., BAIRD, C. E. & SUTHERLAND, E. W. 1973. The importance of calcium ions for the regulation of guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 3889-93.
- SHIBAHARA, S., MULLER, R. M. & TAGUCHI, H. 1987. Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *The Journal of biological chemistry*, 262, 12889-92.
- SHIGA, T. & SUZUKI, N. 2005. Amphipathic alpha-helix mediates the heterodimerization of soluble guanylyl cyclase. *Zoological science*, 22, 735-42.
- SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. & SAIGA, Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59, 223-39.
- SHIVA, S., HUANG, Z., GRUBINA, R., SUN, J., RINGWOOD, L. A., MACARTHUR, P. H., XU, X., MURPHY, E., DARLEY-USMAR, V. M. & GLADWIN, M. T. 2007. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circulation research*, 100, 654-61.
- SIERVO, M., CAPUANO, L. & COLANTUONI, A. 2010. [Physiology and in vivo measurements of nitric oxide in man]. *La Clinica terapeutica*, 161, 173-83.
- SIES, H. 1985. *Oxidative Stress*. London: Academic Press.
- SIES, H. 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, 69, 965-8.
- SINGLETON, J. W. & LASTER, L. 1965. Biliverdin reductase of guinea pig liver. *The Journal of biological chemistry*, 240, 4780-9.
- SKERRA, A. & SCHMIDT, T. G. 2000. Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods in enzymology*, 326, 271-304.
- SMITH, G. E., FRASER, M. J. & SUMMERS, M. D. 1983. Molecular Engineering of the Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Genome: Deletion Mutations Within the Polyhedrin Gene. *Journal of virology*, 46, 584-93.
- STASCH, J. P., BECKER, E. M., ALONSO-ALIJA, C., APELER, H., DEMBOWSKY, K., FEURER, A., GERZER, R., MINUTH, T., PERZBORN, E., PLEISS, U., SCHRODER, H., SCHROEDER, W., STAHL, E., STEINKE, W., STRAUB, A. & SCHRAMM, M. 2001. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature*, 410, 212-5.
- STASCH, J. P., SCHMIDT, P., ALONSO-ALIJA, C., APELER, H., DEMBOWSKY, K., HAERTER, M., HEIL, M., MINUTH, T., PERZBORN, E., PLEISS, U., SCHRAMM, M., SCHROEDER, W., SCHRODER, H., STAHL, E., STEINKE, W. & WUNDER, F. 2002. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *British journal of pharmacology*, 136, 773-83.
- STASCH, J. P., SCHMIDT, P. M., NEDVETSKY, P. I., NEDVETSKAYA, T. Y., H. S. A., MEURER, S., DEILE, M., TAYE, A., KNORR, A., LAPP, H., MULLER, H., TURGAY, Y., ROTHKEGEL, C., TERSTEEGEN, A., KEMP-HARPER, B., MULLER-ESTERL, W. & SCHMIDT, H. H. 2006. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *The Journal of clinical investigation*, 116, 2552-61.

- STATISTISCHES BUNDESAMT. *Krankheitskosten* [Online]. Wiesbaden. Available: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankheitskosten/Krankheitskosten.html> [Accessed 2013-10-04].
- STATISTISCHES BUNDESAMT. *Todesursachen* [Online]. Wiesbaden. Available: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html;jsessionid=70E2240B35B90619D78E1FB2A9E88B60.cae2?nn=50802> [Accessed 2013-10-04].
- STOCKER, R., GLAZER, A. N. & AMES, B. N. 1987a. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 5918-22.
- STOCKER, R., YAMAMOTO, Y., MCDONAGH, A. F., GLAZER, A. N. & AMES, B. N. 1987b. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235, 1043-6.
- STONE, J. R. & MARLETTA, M. A. 1994. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, 33, 5636-40.
- STONE, J. R. & MARLETTA, M. A. 1995. The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane. *Biochemistry*, 34, 16397-403.
- STONE, J. R., SANDS, R. H., DUNHAM, W. R. & MARLETTA, M. A. 1995. Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*, 207, 572-7.
- STRYER, L. & HAUGLAND, R. P. 1967. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58, 719-26.
- SUN, J., HOSHINO, H., TAKAKU, K., NAKAJIMA, O., MUTO, A., SUZUKI, H., TASHIRO, S., TAKAHASHI, S., SHIBAHARA, S., ALAM, J., TAKETO, M. M., YAMAMOTO, M. & IGARASHI, K. 2002. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *The EMBO journal*, 21, 5216-24.
- SZCZESNA-SKORUPA, E., MALLAH, B. & KEMPER, B. 2003. Fluorescence resonance energy transfer analysis of cytochromes P450 2C2 and 2E1 molecular interactions in living cells. *The Journal of biological chemistry*, 278, 31269-76.
- TAKAHASHI, K., HARA, E., SUZUKI, H., SASANO, H. & SHIBAHARA, S. 1996. Expression of heme oxygenase isozyme mRNAs in the human brain and induction of heme oxygenase-1 by nitric oxide donors. *Journal of neurochemistry*, 67, 482-9.
- TAKAHASHI, M., DORE, S., FERRIS, C. D., TOMITA, T., SAWA, A., WOLOSKE, H., BORCHELT, D. R., IWATSUBO, T., KIM, S. H., THINAKARAN, G., SISODIA, S. S. & SNYDER, S. H. 2000. Amyloid precursor proteins inhibit heme oxygenase activity and augment neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Neuron*, 28, 461-73.
- TAKEDA, A., PERRY, G., ABRAHAM, N. G., DWYER, B. E., KUTTY, R. K., LAITINEN, J. T., PETERSEN, R. B. & SMITH, M. A. 2000. Overexpression of heme oxygenase in neuronal cells, the possible interaction with Tau. *The Journal of biological chemistry*, 275, 5395-9.

- TAKEDA, M., KIKUCHI, M., UBALÉE, R., NA-BANGCHANG, K., RUANGWEERAYUT, R., SHIBAHARA, S., IMAI, S. & HIRAYAMA, K. 2005. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. *Japanese journal of infectious diseases*, 58, 268-71.
- TAKETANI, S., KOHNO, H., YOSHINAGA, T. & TOKUNAGA, R. 1989. The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS letters*, 245, 173-6.
- TAMURA, S., KORZEKWA, K. R., KIMURA, S., GELBOIN, H. V. & GONZALEZ, F. J. 1992. Baculovirus-mediated expression and functional characterization of human NADPH-P450 oxidoreductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 293, 219-23.
- TENHUNEN, R., MARVER, H. S. & SCHMID, R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61, 748-55.
- TENHUNEN, R., MARVER, H. S. & SCHMID, R. 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 244, 6388-94.
- TENHUNEN, R., ROSS, M. E., MARVER, H. S. & SCHMID, R. 1970. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization. *Biochemistry*, 9, 298-303.
- THOMAS, M. & KLIBANOV, A. M. 2003. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Applied microbiology and biotechnology*, 62, 27-34.
- THORUP, C., JONES, C. L., GROSS, S. S., MOORE, L. C. & GOLIGORSKY, M. S. 1999. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *The American journal of physiology*, 277, F882-9.
- THURING, R. W., SANDERS, J. P. & BORST, P. 1975. A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Analytical biochemistry*, 66, 213-20.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4.
- TRAKSHEL, G. M., KUTTY, R. K. & MAINES, M. D. 1986. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform. *The Journal of biological chemistry*, 261, 11131-7.
- TSIEN, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67, 509-44.
- TSIEN, R. Y. 2009. Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie*, 48, 5612-26.
- TUDOR, C., LERNER-MARMAROSH, N., ENGELBORGHES, Y., GIBBS, P. E. & MAINES, M. D. 2008. Biliverdin reductase is a transporter of haem into the nucleus and is essential for regulation of HO-1 gene expression by haematin. *The Biochemical journal*, 413, 405-16.
- UNIPROTKB. UniProt Consortium. Available: www.uniprot.org [Accessed 2013-09-08].
- VAUGHN, J. L., GOODWIN, R. H., TOMPKINS, G. J. & MCCAWLEY, P. 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In vitro*, 13, 213-7.

- VERMILION, J. L. & COON, M. J. 1978. Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *The Journal of biological chemistry*, 253, 8812-9.
- VOSS, S. & SKERRA, A. 1997. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein engineering*, 10, 975-82.
- WAGNER, C., PFEIFER, A., RUTH, P., HOFMANN, F. & KURTZ, A. 1998. Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *The Journal of clinical investigation*, 102, 1576-82.
- WAGNER, C., RUSSWURM, M., JAGER, R., FRIEBE, A. & KOESLING, D. 2005. Dimerization of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase requires the alpha 1 N terminus. *The Journal of biological chemistry*, 280, 17687-93.
- WALLRABE, H. & PERIASAMY, A. 2005. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current opinion in biotechnology*, 16, 19-27.
- WALTHER, M., DE CAUL, A., AKA, P., NJIE, M., AMAMBUA-NGWA, A., WALTHER, B., PREDAZZI, I. M., CUNNINGTON, A., DEININGER, S., TAKEM, E. N., EBONYI, A., WEIS, S., WALTON, R., ROWLAND-JONES, S., SIRUGO, G., WILLIAMS, S. M. & CONWAY, D. J. 2012. HMOX1 gene promoter alleles and high HO-1 levels are associated with severe malaria in Gambian children. *PLoS pathogens*, 8, e1002579.
- WANG, J. & DE MONTELLANO, P. R. 2003. The binding sites on human heme oxygenase-1 for cytochrome p450 reductase and biliverdin reductase. *The Journal of biological chemistry*, 278, 20069-76.
- WANG, J., LU, S., MOENNE-LOCCOZ, P. & ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. 2003. Interaction of nitric oxide with human heme oxygenase-1. *The Journal of biological chemistry*, 278, 2341-7.
- WANG, M., ROBERTS, D. L., PASCHKE, R., SHEA, T. M., MASTERS, B. S. & KIM, J. J. 1997a. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 8411-6.
- WANG, R., WANG, Z. & WU, L. 1997b. Carbon monoxide-induced vasorelaxation and the underlying mechanisms. *British journal of pharmacology*, 121, 927-34.
- WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. 1941. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem Z.*, 310, 384-421.
- WEDEL, B., HARTENECK, C., FOERSTER, J., FRIEBE, A., SCHULTZ, G. & KOESLING, D. 1995. Functional domains of soluble guanylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry*, 270, 24871-5.
- WEDEL, B., HUMBERT, P., HARTENECK, C., FOERSTER, J., MALKEWITZ, J., BOHME, E., SCHULTZ, G. & KOESLING, D. 1994. Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 2592-6.
- WENG, Y. H., YANG, G., WEISS, S. & DENNERY, P. A. 2003. Interaction between heme oxygenase-1 and -2 proteins. *J Biol Chem*, 278, 50999-1005.
- WENZL, M. V., BERETTA, M., GRIESBERGER, M., RUSSWURM, M., KOESLING, D., SCHMIDT, K., MAYER, B. & GORREN, A. C. 2011. Site-directed mutagenesis of aldehyde dehydrogenase-2 suggests three distinct

- pathways of nitroglycerin biotransformation. *Molecular pharmacology*, 80, 258-66.
- WHITE, A. A. 1974. Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography. *Methods in enzymology*, 38, 41-6.
- WHITE, A. A. & AURBACH, G. D. 1969. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochimica et biophysica acta*, 191, 686-97.
- WIESNER, B., WEINER, J., MIDDENDORFF, R., HAGEN, V., KAUPP, U. B. & WEYAND, I. 1998. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm. *The Journal of cell biology*, 142, 473-84.
- WILFINGER, W. W., MACKEY, K. & CHOMCZYNSKI, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22, 474-6, 478-81.
- WILLIAMS, S. E., WOOTTON, P., MASON, H. S., BOULD, J., ILES, D. E., RICCARDI, D., PEERS, C. & KEMP, P. J. 2004. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science*, 306, 2093-7.
- WINGER, J. A., DERBYSHIRE, E. R., LAMERS, M. H., MARLETTA, M. A. & KURIYAN, J. 2008. The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase. *BMC structural biology*, 8, 42.
- WINGER, J. A. & MARLETTA, M. A. 2005. Expression and characterization of the catalytic domains of soluble guanylate cyclase: interaction with the heme domain. *Biochemistry*, 44, 4083-90.
- WOOD, J. & GARTHWAITE, J. 1994. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology*, 33, 1235-44.
- XIA, C., PANDA, S. P., MAROHNIC, C. C., MARTASEK, P., MASTERS, B. S. & KIM, J. J. 2011. Structural basis for human NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 13486-91.
- YACHIE, A., NIIDA, Y., WADA, T., IGARASHI, N., KANEDA, H., TOMA, T., OHTA, K., KASAHARA, Y. & KOIZUMI, S. 1999. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 103, 129-35.
- YAMAGUCHI, T., KOMODA, Y. & NAKAJIMA, H. 1994. Biliverdin-IX alpha reductase and biliverdin-IX beta reductase from human liver. Purification and characterization. *The Journal of biological chemistry*, 269, 24343-8.
- YAMAYA, M. & SHIBAHARA, S. 2005. Heme Oxygenase and Human Disease. In: OTTERBEIN, L. E. & ZUCKERBRAUN, B. S. (eds.) *Heme oxygenase : the elegant orchestration of its products in medicine*. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers.
- YANATORI, I., TABUCHI, M., KAWAI, Y., YASUI, Y., AKAGI, R. & KISHI, F. 2010. Heme and non-heme iron transporters in non-polarized and polarized cells. *BMC Cell Biol*, 11, 39.
- YAU, K. W. & BAYLOR, D. A. 1989. Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annual review of neuroscience*, 12, 289-327.
- YI, L., JENKINS, P. M., LEICHERT, L. I., JAKOB, U., MARTENS, J. R. & RAGSDALE, S. W. 2009. Heme regulatory motifs in heme oxygenase-2 form a thiol/disulfide redox switch that responds to the cellular redox state. *The Journal of biological chemistry*, 284, 20556-61.

- YI, L., MORGAN, J. T. & RAGSDALE, S. W. 2010. Identification of a thiol/disulfide redox switch in the human BK channel that controls its affinity for heme and CO. *The Journal of biological chemistry*, 285, 20117-27.
- YI, L. & RAGSDALE, S. W. 2007. Evidence that the heme regulatory motifs in heme oxygenase-2 serve as a thiol/disulfide redox switch regulating heme binding. *The Journal of biological chemistry*, 282, 21056-67.
- YOSHIDA, T., ISHIKAWA, K. & SATO, M. 1991. Degradation of heme by a soluble peptide of heme oxygenase obtained from rat liver microsomes by mild trypsinization. *European journal of biochemistry / FEBS*, 199, 729-33.
- YOSHIDA, T. & SATO, M. 1989. Posttranslational and direct integration of heme oxygenase into microsomes. *Biochemical and biophysical research communications*, 163, 1086-92.
- YOUVAN, D. C., SILVA, C. M., BYLINA, E. J., COLEMAN, W. J., DILWORTH, M. R. & YANG, M. M. 1997. Calibration of Fluorescence Resonance Energy Transfer in Microscopy Using Genetically Engineered GFP Derivatives on Nickel Chelating Beads. *Biotechnology et alia*, 3:1-18, 1-18.
- YUEN, P. S., POTTER, L. R. & GARBERS, D. L. 1990. A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry*, 29, 10872-8.
- ZABEL, U., HAUSLER, C., WEEGER, M. & SCHMIDT, H. H. 1999. Homodimerization of soluble guanylyl cyclase subunits. Dimerization analysis using a glutathione s-transferase affinity tag. *The Journal of biological chemistry*, 274, 18149-52.
- ZAKHARY, R., POSS, K. D., JAFFREY, S. R., FERRIS, C. D., TONEGAWA, S. & SNYDER, S. H. 1997. Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 14848-53.
- ZHANG, L. & GUARENTE, L. 1994. HAP1 is nuclear but is bound to a cellular factor in the absence of heme. *The Journal of biological chemistry*, 269, 14643-7.
- ZHANG, L. & GUARENTE, L. 1995. Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *The EMBO journal*, 14, 313-20.
- ZHANG, Y., FURUYAMA, K., ADACHI, T., ISHIKAWA, K., MATSUMOTO, H., MASUDA, T., OGAWA, K., TAKEDA, K., YOSHIZAWA, M., OGAWA, H., MARUYAMA, Y., HIDA, W. & SHIBAHARA, S. 2006a. Hypoxemia and attenuated hypoxic ventilatory responses in mice lacking heme oxygenase-2: evidence for a novel role of heme oxygenase-2 as an oxygen sensor. *Adv Exp Med Biol*, 580, 161-6; discussion 351-9.
- ZHANG, Y., FURUYAMA, K., KANEKO, K., DING, Y., OGAWA, K., YOSHIZAWA, M., KAWAMURA, M., TAKEDA, K., YOSHIDA, T. & SHIBAHARA, S. 2006b. Hypoxia reduces the expression of heme oxygenase-2 in various types of human cell lines. A possible strategy for the maintenance of intracellular heme level. *FEBS J*, 273, 3136-47.
- ZHAO, Y., BRANDISH, P. E., DI VALENTIN, M., SCHELVIS, J. P., BABCOCK, G. T. & MARLETTA, M. A. 2000. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry*, 39, 10848-54.
- ZHAO, Y., SCHELVIS, J. P., BABCOCK, G. T. & MARLETTA, M. A. 1998. Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. *Biochemistry*, 37, 4502-9.

- ZHOU, Z., GROSS, S., ROUSSOS, C., MEURER, S., MULLER-ESTERL, W. & PAPAPETROPOULOS, A. 2004. Structural and functional characterization of the dimerization region of soluble guanylyl cyclase. *The Journal of biological chemistry*, 279, 24935-43.
- ZUCKERBRAUN, B. S., BILLIAR, T. R., OTTERBEIN, S. L., KIM, P. K., LIU, F., CHOI, A. M., BACH, F. H. & OTTERBEIN, L. E. 2003. Carbon monoxide protects against liver failure through nitric oxide-induced heme oxygenase 1. *The Journal of experimental medicine*, 198, 1707-16.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen von HO-1 und HO-2..... | 10 |
| Abbildung 1.2: Schematische Übersicht des Hämabbaus | 11 |
| Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des NO/cGMP Signalweges..... | 19 |
| Abbildung 1.4: Strukturmodell der NOsGC | 21 |
| Abbildung 3.1: Bacmid-Überprüfung mittels PCR | 49 |
| Abbildung 3.2: Das Bac-to-Bac® Expressionssystem | 49 |
| Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Anreinigung | 55 |
| Abbildung 3.4: Kalibrationsgerade der Gelfiltration | 57 |
| Abbildung 3.5: Übersicht über die vorhandenen Fluoreszenzproteine..... | 62 |
| Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Auftretens von FRET..... | 63 |
| Abbildung 3.7: Anregungs- und Emissionsspektren von Donor | 64 |
| Abbildung 3.8: Messung der Abnahme der Fluoreszenzintensität..... | 66 |
| Abbildung 4.1: Aktivitätsbestimmung von HO-1 und HO-2 | 70 |
| Abbildung 4.2: Aktivitätsbestimmung der Mutanten von HO-1 und HO-2 | 70 |
| Abbildung 4.3: Aktivitätsbestimmungen nach der Anreinigung der HOs..... | 71 |
| Abbildung 4.4: Einfluss verschiedener CPR-Konzentrationen | 72 |
| Abbildung 4.5: SDS-PAGE der Koanreinigungen von HO und CPR..... | 74 |
| Abbildung 4.6: Western-Detektion der HO-Isoenzyme und der Deletionsmutanten..... | 74 |
| Abbildung 4.7: Aktivitätsbestimmungen der HO-CPR-Koinfektionen..... | 75 |
| Abbildung 4.8: Aktivitätsbestimmungen der verkürzten HO-CPR-Koinfektionen..... | 76 |
| Abbildung 4.9: Gelfiltrationen der HOs und den Koinfektionen mit CPR | 77 |
| Abbildung 4.10: FRET-Bestimmungen von CFP-HO und CPR-YFP | 80 |
| Abbildung 4.11: Bestimmung der FRET Effizienzen von CPR-CFP und YFP-HO | 81 |
| Abbildung 4.12: Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit | 82 |
| Abbildung 4.13: Translokationsuntersuchungen der HOs nach Hypoxie-Inkubation.... | 84 |
| Abbildung 4.14: Einfluss von CPR auf die Translokation von HO..... | 86 |
| Abbildung 4.15: Einfluss der hBVR auf die Translokation von HO..... | 87 |
| Abbildung 4.16: Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die Viabilität | 88 |
| Abbildung 4.17: Aktivitätsbestimmung der HO-2 CPF-Mutante..... | 89 |
| Abbildung 4.18: Translokationsuntersuchungen der HOs nach Hämin-Inkubation..... | 90 |
| Abbildung 4.19: Untersuchung des Einflusses von 100 µM Hämin auf die Viabilität .. | 91 |
| Abbildung 4.20: NOsGC-Aktivitätsbestimmungen im Sf9-Cytosol | 92 |
| Abbildung 4.21: NOsGC-Aktivitätsbestimmungen nach der Anreinigung..... | 93 |
| Abbildung 4.22: Untersuchung des Redox-Potentials der NOsGC | 94 |
| Abbildung 4.23: Aktivitätsbestimmung der inaktiven HO-Mutanten | 96 |
| Abbildung 4.24: NOsGC-Aktivitätsbestimmung in Anwesenheit von DEA/NO | 97 |
| Abbildung 4.25: NOsGC-Aktivitätsbestimmung in Anwesenheit von Cinaciguat | 98 |
| Abbildung 4.26: Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analyse..... | 99 |
| Abbildung 5.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der α_1 -Untereinheit | 107 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------|---|
| AcMNPV | <u>A</u> utographa <u>c</u> alifornica <u>M</u> ulticapsid <u>N</u> uclear <u>P</u> olyhedrosis <u>V</u> irus |
| ALAS | δ-Aminolävulinsäure-Synthase (<u>a</u> mino <u>l</u> evulinic <u>a</u> cid <u>s</u> ynthase) |
| BACH1 | <u>B</u> TB <u>a</u> nd <u>C</u> NC <u>h</u> omolog 1 |
| Bluo-Gal | 5-Bromo-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid |
| bp | <u>B</u> asen <u>p</u> aar |
| BK _{Ca} -Kanal | Calcium-aktivierter Kalium-Kanal (<u>b</u> ig-conductance <u>c</u> alcium-activated <u>K</u> -channel) |
| BRET | <u>B</u> iolumineszenz- <u>R</u> esonanz- <u>E</u> nergie- <u>T</u> ransfer |
| BSA | Rinderserumalbumin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin) |
| BVR | <u>B</u> ili <u>v</u> er <u>d</u> in <u>r</u> eduktase |
| cAMP | <u>c</u> yclisches <u>A</u> denosin-3',5'- <u>m</u> onophosphat |
| CC | <u>c</u> oiled- <u>c</u> oil |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<u>c</u> omplementary <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid) |
| CFP | <u>c</u> yan- <u>f</u> luoreszierendes <u>P</u> rotein |
| cGK | <u>c</u> GMP-abhängige Protei <u>n</u> ki <u>n</u> ase |
| cGMP | <u>c</u> yclisches <u>G</u> uanosin-3',5'- <u>m</u> onophosphat |
| Ci | <u>C</u> urie |
| CNG | <u>c</u> yclic <u>n</u> ucleotide- <u>g</u> ated |
| CO | Kohlenstoffmonoxid (<u>c</u> arbon mon <u>o</u> xide) |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid (<u>c</u> arbon di <u>o</u> xide) |
| cpm | Zählereignisse pro Minute (<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute) |
| CPR | NADPH- <u>C</u> ytochrom- <u>P</u> 450-Oxidore <u>d</u> uktase |
| CYP | <u>C</u> ytochrom- <u>P</u> 450 |
| Da | <u>D</u> alton |
| DEA/NO | 1,1-Diethyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazin; <u>D</u> iethyl <u>a</u> min <u>N</u> ONOate Natriumsalz-Hydrat |
| DMEM | <u>D</u> ulbecco`s <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium |
| DMSO | <u>D</u> imethyl <u>s</u> ulf <u>o</u> xid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid) |
| dNTP | 2'- <u>D</u> esox <u>y</u> nukleosid-5'- <u>t</u> riphosphat |
| DTT | <u>D</u> ithiothreitol |

| | |
|------------------|---|
| eCFP | verbessertes CFP (<i>enhanced CFP</i>) |
| ECL | verstärkte Chemielumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>) |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EC ₅₀ | mittlere (halbmaximale) effektive Konzentration |
| EDRF | Endothelialer relaxierender Faktor (<i>endothelium derived relaxing factor</i>) |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| EEO | Elektroendoosmose |
| eNOS | endotheliale NO-Synthase |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| eYFP | verbessertes YFP (<i>enhanced YFP</i>) |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinukleotid |
| FBS | fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>) |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| FPLC | Flüssigkeitschromatografie (<i>fast protein liquid chromatography</i>) |
| FRET | Förster-Resonanz-Energie-Transfer |
| g | Erdbeschleunigung |
| GC | Guanylyl-Cyclase |
| GFP | grün-fluoreszierendes Protein |
| Grx1 | Glutaredoxin-1 |
| GSH | Glutathion |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat |
| HABA | 2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure |
| hBVR | humane Biliverdinreduktase |
| HCl | Chlorwasserstoffsäure (<i>Salzsäure</i>) |
| HEK | Humane embrionale Nierenzellen (<i>human embryonal kidney cells</i>) |
| HRP | Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| HMOX | codierendes Gen der Hämoxygenase |
| HO | Hämoxygenase |
| HS | Homo Sapiens |
| HSP | Hitzeschockprotein (<i>heat shock protein</i>) |
| IBMX | 3-Isobutyl-1-methylxanthin |

| | |
|-----------------|--|
| IEP | Isoelektrischerpunkt |
| Ig | Immunglobulin |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| IRP2 | iron regulatory protein 2 |
| K _d | Dissoziationskonstante |
| K _m | Michaelis-Menten-Konstante |
| Laser | Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation |
| LB | Lysogeny Broth |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MOI | Infektionshäufigkeit (<i>multiplicity of infection</i>) |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NADPH | Nicotinamidadeninukleotidphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| nNOS | neuronale NO-Synthase |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | NO-Synthase |
| NOsGC | NO-sensitive Guanylyl-Cyclase |
| NRF2 | Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OD | optische Dichte |
| ODQ | 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-on |
| ³² P | Phosphor 32 |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PEI | Polyethylenimin |
| <i>Pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| pfu | Plaqueformende Einheit (<i>plaque forming unit</i>) |
| PIC | Protease Inhibitor Cocktail |
| PKG | Proteinkinase G |
| PPIX | Protoporphyrin IX |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| RONS | reaktive Sauerstoff- und Nitrogenspezies (<i>reactive oxygen and nitrogen species</i>) |

| | |
|-----------------------|--|
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>) |
| S | <i>Strep-tag</i> [®] II |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SDS-PAGE | <u>SDS</u> -Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SEM | mittlerer Fehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>) |
| Sf | <i>Spodoptera frugiperda</i> |
| sGC | lösliche Guanylyl-Cyclase (<i>soluble guanylyl cyclase</i>) |
| SOC | komplexes Nährmedium für Bakterienwachstum mit Glukosezusatz (<i>super optimal broth with catabolite repression</i>) |
| STE | <u>S</u> odium- <u>C</u> hlorid, <u>T</u> ris, <u>E</u> DTA |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TAE | <u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA |
| TBST | Tris-gepufferte salinische Tween [®] -Lösung, (<i>Tris buffered saline tween</i>) |
| TCID ₅₀ | Viruskonzentration, die 50% der Zellkultur infiziert (<i>tissue culture infective dose 50</i>) |
| TD | Durchlicht (<i>transmitted light</i>) |
| TEA | <u>T</u> riethanol <u>a</u> min |
| TEMED | N,N,N',N'- <u>t</u> etramethylethylend <u>a</u> min |
| Tris | <u>T</u> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tween [®] 20 | Polyoxyethylensorbitanmonolaurat |
| UV/Vis | <u>u</u> ltravioletter/sichtbarer (<i>visible</i>) Lichtbereich |
| V _{max} | maximale enzymatische Umsatzgeschwindigkeit |
| <i>well</i> | Vertiefung einer Zellkulturplatte |
| YC-1 | 3-[5'-Hydroxymethyl-2'-furyl]-1-benzylindazol |
| YFP | gelb-fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>) |

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, mich stets unterstützt und wenn nötig auch aufgebaut haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Sönke Behrends, der mir einen Arbeitsplatz am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der TU Braunschweig und das Promotionsthema zur Verfügung gestellt hat. Mit seiner freundlichen und ruhigen Art konnte er mich auch in schwierigen Zeiten motivieren. Seine stete Bereitschaft bei Problemen zu helfen, führte letztendlich dazu, dass ich die Arbeit zu Ende führen konnte. Bei Herrn Professor Ingo Rustenbeck bedanke ich mich für die Verfassung des Zweitgutachtens. Unserer Sekretärin, Frau Susanne Hornig, danke ich für die Hilfe bei vielen organisatorischen Dingen. Allen anderen Kollegen und mittlerweile auch ehemaligen Kollegen möchte ich vor allem für das tolle Arbeitsklima danken, das sich auch in unseren vielen gemeinsamen und schönen Aktivitäten außerhalb der Uni widerspiegelt hat. Das miteinander Arbeiten und das gegenseitige Unterstützen und Aushelfen im Labor ist nicht immer selbstverständlich und es hat viel dazu beigetragen, dass ich gerne zur Arbeit gekommen bin. Ganz besonders möchte ich auch nochmal Jan und Mareike erwähnen: Danke, für die schönen Mittwochabende, das leckere Essen und eure offenen Ohren!

Den fleißigen Korrekturlesern danke ich für die hilfreichen Anregungen und ihre Geduld.

Meiner Familie kann ich gar nicht genug danken, für alles was sie in meinem Leben für mich getan hat. Sie hat mich immer unterstützt. Durch ihre Liebe und Fürsorge bin ich zu dem Menschen geworden, der ich heute bin.

Meinen Schwiegereltern danke ich für die Unterstützung besonders in Form von Babysitting und warmen Mahlzeiten.

Zu guter Letzt bleiben noch mein Mann Christoph und mein Sohn Justus: ich kann es gar nicht in Worte fassen, welche Stütze Ihr für mich wart. DANKE!